

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**SWITCH DE INMUNOGLOBULINAS ENTRE MADRE Y PRODUCTO
INFECTADOS CON *Trichinella spiralis* EN MODELO MURINO**

POR

LETICIA ANGÉLICA DE AVILA ELÍAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

JUNIO, 2017

SWITCH DE INMUNOGLOBULINAS ENTRE MADRE Y PRODUCTO

INFECTADOS CON *Trichinella spiralis* EN MODELO MURINO

Comité de Tesis

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Presidente

Dra. María Porfiria Barrón González
Secretario

Dra. Ma. Eufemia Morales Rubio
Vocal 1

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal 2

Dra. Ruth Amelia Garza Padrón
Vocal 3

SWITCH DE INMUNOGLOBULINAS ENTRE MADRE Y PRODUCTO

INFECTADOS CON *Trichinella spiralis* EN MODELO MURINO

Dirección de Tesis

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Director

Dra. María Alejandra Moreno García
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por darme salud y fuerza para lograr terminar una meta más en mi vida, agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Biológicas de ésta Universidad y al Laboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, por permitirme llevar acabo mi proyecto de tesis en sus instalaciones, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mi mamá María Luisa Elías Hernández y a mi abuelita María Luisa Hernández Tenorio, por ser siempre el pilar de mi vida, quienes a pesar de todo me apoyan para hacer lo que me he propuesto, a mi hermano y mi familia.

Agradezco a la Dra. en C. María Alejandra Moreno García quien no dudó apoyarme en seguir adelante después de haber tenido una mala experiencia y llevarme a lograr lo que hoy culmina, al Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta por darme su voto de confianza y brindarme la oportunidad de ser parte de un proyecto de maestría en la UANL, a la Dra. María Porfiria Barrón González por brindarme su apoyo, ayuda, consejos y paciencia desde el primer momento que estuve en la UANL y a la Dra. Lilia H. Morales Ramos, por ayudarme a terminar el proyecto de maestría.

Quiero agradecer también a todas las personas que estuvieron conmigo, en las buenas, en las malas, las que no me dejaron caer y las que creyeron en mí en todo momento, a mi mejor amiga Ilse Valeria, a Luz Priscilla, José Luis, Moisés, María del Rosario, Mayra, Gabriela Reveles, Sergio Saldívar, Dra. Claudia Maldonado, Diego Cesar, Francisca, Laura Rodríguez, Fabiola Cuellar, Eduardo Treviño, Carmen, Jorge Garza, Diego Benítez, Karla Pérez, Cesar Romo, y a todos mis compañeros de la UANL que me enseñaron tantas cosas en tan poco tiempo, que me brindaron amistad y cariño, muchas gracias, y por último quiero agradecer a todos mis maestros que han sido, son y serán la guía para siempre salir adelante.

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado principalmente a Dios, que fue quien me puso en este camino, también dedico con amor y con orgullo mi tesis a mi mamá María Luisa Elías Hernández, que aún y con la distancia y con dificultades siempre estuvo ahí como lo ha estado siempre.

Dedico mi tesis a todas las personas que de alguna manera estuvieron en mi vida y me ayudaron con este proyecto, seguido de Dios y de mi mamá, lo dedico a mi asesora la Dra. en C. María Alejandra Moreno García, por brindarme una oportunidad de superación, a mi amiga Ilse Valeria que aún y a la distancia siempre estuvo y está presente dándome sus consejos y ánimos para seguir, también dedico este proyecto para todas las personas que están y las que se fueron de mi vida, porque aún y con su ausencia me dejaron un aprendizaje.

José Luis, Moisés Delgado, María del Rosario, Mayra Zamora, Luz Priscilla, Diego Cesar, Francisca, Laura Rodríguez, Fabiola Cuellar, Eduardo Treviño, amigos y compañeros de Zacatecas y Nuevo León, gracias por tanto y por todo, con alegría y orgullo les dedico una meta más en mi vida en la cual están y estuvieron presentes.

La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante, nunca desistas de un sueño, sólo trata de ver las señales que te lleven a él porque cuando alguien desea algo debe saber que corre riesgos y por eso la vida vale la pena.

Paulo Coelho

CONTENIDO GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE GRAFICAS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	5
ANTECEDENTES.....	6
Taxonomía de <i>Trichinella</i>	7
Morfología y estructura.....	10
Epidemiología y Distribución geográfica mundial de <i>Trichinella</i>	13
Epidemiología y Distribución geográfica en México	14
Epidemiología y Distribución geográfica en el Estado de Zacatecas	15
Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	17
Infectividad	21
Viabilidad.....	22
Aspectos inmunológicos	23
En la fase intestinal	24
En la fase de migración y de infección muscular.....	24
Las inmunoglobulinas	25
Unidad estructural básica	25
Características de los distintos tipos de inmunoglobulinas.....	26
Distribución de las inmunoglobulinas.....	26
Propiedades y función de cada una de las inmunoglobulinas	26
Inmunoglobulina G (IgG)	26
Inmunoglobulina M (IgM)	27

Inmunoglobulina A (IgA)	27
Inmunoglobulina D (IgD)	28
Inmunoglobulina E (IgE)	28
La placenta	29
Funciones de la placenta	30
Nutrición	30
Eliminación de desechos	30
Funciones endócrinas	30
Tolerancia inmunológica.....	31
Protección biológica.....	31
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVOS	34
Objetivo general	34
Objetivos particulares.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
Diseño experimental.....	35
Infección del modelo experimental.....	36
Obtención del suero.....	36
Determinación de eosinofilia.	36
Técnica de compresión en placa	37
Cuantificación de carga parasitaria.	37
Viabilidad de azul tripano	37
Técnica Histológica: Hematoxilina-Eosina (H/E).	38
Obtención del antígeno soluble total de <i>T. spiralis</i> . (AST).....	39
Determinación de proteínas.....	39
Microinmunodifusión doble (MIDD).	40
Técnica de Dot – ELISA.	40
Inmunofluorescencia	40
Procesamiento de datos	41
RESULTADOS.....	42
Órganos reproductores de la hembra y el macho en rata y ratón	42

Histología de animales adultos	45
Ratas adultas.....	45
Grupos en proceso de gestación.....	47
Ratones adultos	48
Eosinofilia de animales adultos.....	50
Determinación de implantación en hembras y machos.....	52
Cuantificación de carga parasitaria en hembras y machos.....	55
Viabilidad.....	57
Obtención de AST y Determinación del Patrón Antigénico del AST de <i>T. spiralis</i>	58
Técnica de microinmunodifusión doble (MIDD) en ratas y ratones adultos	59
Dot-ELISA de ratas y ratones adultos.....	60
Inmunofluorescencia con sueros de ratas y ratones adultos	61
Histología de animales retados	64
Productos retados con <i>T. spiralis</i>	64
Eosinofilia de animales retados.....	66
Determinación de implantación de LI de <i>T. spiralis</i> en hembras y machos retados.....	67
Cuantificación de carga parasitaria en hembras y machos retados	70
Viabilidad con azul tripano	71
Técnica de microinmunodifusión doble (MIDD) en ratas y ratones retados	72
Dot-ELISA en ratas y ratones retados.....	73
Inmunofluorescencia con sueros de ratas y ratones retados	74
Histología de animales de seguimiento.....	77
Productos de seguimiento.....	77
Eosinofilia de animales de seguimiento.....	78
Técnica de microinmunodifusión doble (MIDD) en ratas y ratones de seguimiento	79
Dot-ELISA en ratas y ratones de seguimiento.....	81
Inmunofluorescencia con sueros de ratas y ratones de seguimiento.....	82
DISCUSIÓN	86
CONCLUSIÓN	96
PERSPECTIVAS	97
BIBLIOGRAFÍA	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la larva infectante de <i>T. spiralis</i>	10
Figura 2. Morfología del macho adulto de <i>T. spiralis</i>	11
Figura 3. Morfología de la hembra adulta de <i>T. spiralis</i>	12
Figura 4. Distribución geográfica mundial de las especies de <i>Trichinella</i>	14
Figura 5. Distribución geográfica de <i>T. spiralis</i> en México	15
Figura 6. Distribución geográfica de <i>T. spiralis</i> en Zacatecas	17
Figura 7. Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	19
Figura 8. Estructura de la unidad monomérica de las inmunoglobulinas	25
Figura 9. Órganos reproductores de ratas y ratones	42
Figura 10. Cuernos uterinos de ratas y ratones	43
Figura 11. Productos de ratas y ratones adultos	44
Figura 12. Tejidos de las trompas uterinas del grupo control sano y de las ratas adultas infectadas.....	45
Figura 13. Tejidos del grupo control sano y de las ratas adultas infectadas	46
Figura 14. Tejidos del grupo en proceso de gestación	47
Figura 15. Tejidos de las trompas uterinas del grupo control sano y de los ratones adultos infectados.....	48
Figura 16. Tejidos del grupo control sano y de los ratones adultos infectados	49
Figura 17. Eosinófilos presentes en sangre periférica.....	50
Figura 18. Tejidos musculares de ratas adultas con la presencia de LI de <i>T. spiralis</i>	52
Figura 19. Tejidos musculares de ratones adultos con la presencia de LI de <i>T. spiralis</i>	54
Figura 20. LI obtenidas por medio de la digestión artificial	55
Figura 21. Tejido muscular y LI de animales adultos teñidos con azul tripano.....	57
Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	58
Figura 23. MIDD con sueros de ratas Long-Evans y ratones Balb/c adultos infectados con <i>T. spiralis</i>	59
Figura 24. Dot-ELISA con sueros de ratas y ratones adultos infectados con LI de <i>T. spiralis</i>	61

Figura 25. IFI con anticuerpos policlonal, IgG e IgA en sueros de ratas Long-Evans adultas infectadas con <i>T. spiralis</i>	62
Figura 26. IFI con IgA, IgM e IgG en sueros de ratones Balb/c adultos infectados con <i>T. spiralis</i>	63
Figura 27. Tejidos del grupo de ratas adultas y retadas con 500, 750 y 1000 LI de <i>T. spiralis</i>	64
Figura 28. Tejidos del grupo de ratones retados con 125 y 250 LI de <i>T. spiralis</i>	65
Figura 29. Tejidos musculares de ratas retadas con LI de <i>T. spiralis</i>	67
Figura 30. Tejidos musculares de ratones retados con LI de <i>T. spiralis</i>	69
Figura 31. Tejidos musculares de animales retados teñidos con azul tripano	71
Figura 32. MIDD con sueros de ratas y ratones retados con <i>T. spiralis</i>	72
Figura 33. Dot-ELISA con sueros de ratas y ratones retados con 500, 750 y 1000 LI y 125 y 250 LI de <i>T. spiralis</i>	74
Figura 34. IFI con anticuerpos policlonal, IgG e IgA en sueros de ratas Long-Evans retadas	75
Figura 35. IFI con anticuerpos IgA, IgM e IgG en sueros de ratones Balb/c retados.....	76
Figura 36. Tejidos del grupo de ratas y ratones de seguimiento	77
Figura 37. MIDD con sueros de ratas y ratones de seguimiento	79
Figura 38. Dot-ELISA con sueros de ratas y ratones de seguimiento de padres infectados con 500, 750 y 1000 LI y 125 y 250 LI de <i>T. spiralis</i>	82
Figura 39. IFI con anticuerpos policlonal, IgG e IgA en sueros de ratas Long-Evans de seguimiento	83
Figura 40. IFI con anticuerpos IgA, IgM e IgG en sueros de ratones Balb/c de seguimiento	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Trichinella spp.</i>	8
Tabla 2. Especies y genotipos de <i>Trichinella</i> identificados, distribución y hospederos	9
Tabla 3. Ciclo de <i>T. spiralis</i> , cronología en el huesped	20
Tabla 4. Curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB)	39
Tabla 5. Reacción Ag-Ac por MIDD de sueros de ratas Long-Evans y ratones Balb/c adultos.	59
Tabla 6. Dot-ELISA con anticuerpos policlonal, IgG, IgM e IgA con sueros de ratas Long Evans adultas infectadas con <i>T. spiralis</i> a diferentes tiempos.....	60
Tabla 7. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonal, IgG e IgA con sueros de ratas Long Evans adultas infectadas con <i>T. spiralis</i> a los 3 meses de infección.....	61
Tabla 8. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgA, IgM e IgG con sueros de ratones Balb/c adultos infectados con <i>T. spiralis</i> a los 3 meses de infección.....	62
Tabla 9. Reacción Ag-Ac por MIDD de sueros de ratas Long-Evans hembras y machos retados, así como sueros de ratones Balb/c hembras y machos retados.....	72
Tabla 10. Dot-ELISA con anticuerpos policlonal, IgG, IgM e IgA con sueros de ratas Long-Evans y ratones Balb/c retadas con <i>T. spiralis</i> a diferentes tiempos.....	73
Tabla 11. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonal, IgG e IgA con sueros de ratas Long-Evans retadas al primer y último sangrado con 500, 750 y 1000 LI de <i>T. spiralis</i>	74
Tabla 12. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgA, IgM e IgG con sueros de ratones Balb/c retados a la primera y última toma de sangre con 125 y 250 LI de <i>T. spiralis</i>	76
Tabla 13. Reacción Ag-Ac por MIDD de sueros de productos de ratas Long-Evans hembras y machos de seguimiento, así como ratones Balb/c hembras y machos de seguimiento	80
Tabla 14. Dot-ELISA con anticuerpos policlonal, IgG, IgM e IgA con sueros de ratas Long-Evans y ratones Balb/c retados con <i>T. spiralis</i> a diferentes tiempos	81

Tabla 15. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonal, IgG e IgA con sueros de ratas Long-Evans de seguimiento a la primera y última toma de sangre con 500, 750 y 1000 LI de <i>T. spiralis</i>	82
Tabla 16. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgA, IgM e IgG con sueros de ratones Balb/c de seguimiento a la primera y última toma de sangre con 125 y 250 LI de <i>T. spiralis</i>	84

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Eosinofilia periférica en ratas Long-Evans adultas infectadas con <i>T. spiralis</i> ...	51
Gráfica 2. Eosinofilia periférica en ratones Balb/c adultos infectados con <i>T. spiralis</i>	51
Gráfica 3. Implantación de <i>T. spiralis</i> en tejido muscular de ratas Long-Evans adultas	53
Gráfica 4. Implantación de <i>T. spiralis</i> en tejido muscular de ratones Balb/c adultos	55
Gráfica 5. Carga parasitaria de ratas adultas Long-Evans	56
Gráfica 6. Carga parasitaria de ratones adultos Balb/c	56
Gráfica 7. Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB)	58
Gráfica 8. Eosinofilia periférica en ratas Long-Evans retadas con <i>T. spiralis</i>	66
Gráfica 9. Eosinofilia periférica en ratones Balb/c retados con <i>T. spiralis</i>	67
Gráfica 10. Implantación de <i>T. spiralis</i> en tejido muscular de ratas Long-Evans retadas ...	68
Gráfica 11. Implantación de <i>T. spiralis</i> en tejido muscular de ratones Balb/c retados	69
Gráfica 12. Carga parasitaria de ratas adultas y ratas retadas Long-Evans	70
Gráfica 13. Carga parasitaria de ratones adultos y ratones retados Balb/c	71
Gráfica 14. Eosinofilia periférica en ratas Long-Evans de seguimiento.....	78
Gráfica 15. Eosinofilia periférica en ratones Balb/c de seguimiento.....	79

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

Ag-Ac: Antígeno-Anticuerpo

AF: Adult female/ hembra adulta

AM: Adult male/ macho adulto

ASB: Albúmina Sérica Bovina

AST: Antígeno soluble total

Células Th1/2: Células T helper (colaboradoras) 1/2

Células TCD4+: Linfocitos Th maduros que expresan su proteína de superficie CD4

Células TCD8+: Linfocitos Th citotóxicos que expresan su proteína de superficie CD8

DAB: Diaminobencidina

EGPA: Electroforesis en geles de poliacrilamida

Fc: Fragmento cristalino

HCl: Ácido clorhídrico

IFI: Inmunofluorescencia secundaria o indirecta

Ig: Inmunoglobulinas

IL: Interleucina

ITS: Infecciones de transmisión sexual

kDa: kilo Daltones

LI: Larva infectante

LM: Larva muscular

LRN: Larva recién nacida

MIDD: Micro-Inmuno-Difusión Doble

NC: Nitrocelulosa

NK: Natural killer o asesina natural

PBS: Phosphate buffered saline/buffer salino de fosfatos

Rpm: Revolución por minuto

T. spiralis: *Trichinella spiralis*

Tinción H-E: Hematoxilina-eosina

Th: T helper

WB: Western Blot

RESUMEN

La trichinellosis es una zoonosis endémica causada por diferentes especies del género de *Trichinella* de distribución mundial que aún sigue vigente, es transmitida al hombre por el consumo de carne de cerdo mal cocida infectada con la larva infectante (LI) de *Trichinella spiralis*. Existen algunas especies en las que ya se ha observado el paso de anticuerpos de la madre al producto, por lo que ahora se tiene el interés en determinar si el paso de éstos anticuerpos maternos confieren protección al producto. En base a esto se plantea el objetivo de caracterizar el Switch de inmunoglobulinas de la madre, el producto y evaluar si le confiere protección al producto al reto con LI de *T. spiralis*. En este estudio se utilizaron 24 ratas: 12 hembras y 12 machos, y 24 ratones: 12 hembras y 12 machos de dos meses y medio de edad, se hicieron 4 grupos de 3 animales y a cada grupo se le pusieron 3 machos para el proceso de fecundación, el cual fue monitoreado con un frotis vaginal para verificar la presencia de espermatozoides, comprobada la fecundación las ratas fueron infectadas con 500, 750 y 1000 LI y los ratones con 125, 250 y 500 LI, se contó con un grupo control de gestación y a cada grupo se le hizo el seguimiento de la gestación, se sacrificaron 3 animales a las dos semanas de gestación para valorar la presencia del parásito en la placenta por técnicas histológicas, y a los grupos restantes se les hizo el seguimiento de nacimiento y toma de muestra de suero cada mes por 6 meses para evaluar la cinética de anticuerpos, la mitad de los grupos de animales se infectaron y se valoró la respuesta inmune y la carga parasitaria, todo esto mediante técnicas directas como compresión en placa, cuantificación de carga parasitaria mediante la técnica de digestión artificial, tinción de hematoxilina-eosina para ver las características histológicas de la célula nodriza y la viabilidad de azul tripano para observar las LI viables y muertas, las otras técnicas que fueron utilizadas son las indirectas como las MIDD, Dot-ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI), donde se evaluó mediante el suero del animal la presencia de anticuerpos de *T. spiralis*. El modelo estadístico que avala el trabajo fue realizado por el software Graphpad PRISM versión 6 empleando la tabla ANOVA para demostrar los niveles de confianza y el grado de error que existen por parte de los resultados, tomando en cuenta los grupos: anticuepos, la carga parasitaria y efecto de protección.

ABSTRACT

The trichinellosis is endemic zoonosis caused by different species of the genus *Trichinella* worldwide distribution that is still alive, is transmitted to humans by eating undercooked pork infected with the infective larvae (LI) of *Trichinella spiralis*. There are some species that has already been observed the passage of antibodies from the mother to the product, so now you have the interest to determine whether the passage of these maternal antibodies confer protection to the product. On this basis to characterize the immunoglobulin Switch mother, the product and evaluate whether the product gives protection to challenge with *T. spiralis* LI arises. In this study, 24 rats: 12 females and 12 males, and 24 mice: 12 females and 12 males two and a half months of age were used, 4 groups of 3 animals and each group was placed 3 males for the fertilization process were made, the which was monitored with a vaginal smear to check for sperm proven fertilization rats were infected with 500, 750 and 1000 LI and mice with 125, 250 and 500 LI, he had control of gestation group and each group It was made tracking gestation, 3 animals were sacrificed at two weeks of gestation to assess the presence of the parasite in the placenta by histological techniques, and the remaining groups were asked track birth and taking serum sample each month for 6 months to evaluate the kinetics of antibodies, half of the groups of animals were infected and immune response and parasite burden was assessed, all this by techniques direct and compression plate, quantification of parasitic load by digestion technique artificial, hematoxylin-eosin for histologic characteristics of the mother cell and viability of trypan blue to observe the viable and dead LI, the other techniques that were used are indirect as MIDD, Dot-ELISA and indirect immunofluorescence (IFI), which was assessed by serum of the animal the presence of antibodies to *T. spiralis*. The statistical model that supports the work was done by Graphpad PRISM version 6 software using ANOVA table to show confidence levels and the degree of error that exist by the results, taking into account the groups: antibodies, the parasite load and protective effect.

INTRODUCCIÓN

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria zoonótica distribuida a nivel mundial estrechamente relacionada a hábitos culturales y la dieta, es causada principalmente por *Trichinella spiralis* que afecta a la mayoría de los mamíferos silvestres y domésticos, se transmite de modo accidental al hombre debido a la ingesta de carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida, siendo una zoonosis endémica en el estado de Zacatecas desde 1976. La epidemiología de trichinellosis está en constante revisión, incluso a nivel mundial se ha considerado como una infección reemergente pues han aparecido especies nuevas, producto de que el hombre ha invadido otros hábitats exponiéndose así a nuevos ciclos de infección (Sánchez *et al.*, 2006; Builes *et al.*, 2009; Krivokapich *et al.*, 2012).

La cutícula y elementos del tubo digestivo de *Trichinella* son capaces de desencadenar una respuesta de tipo inmune, específicamente los esticocitos. El huésped presenta respuesta inmune a estos elementos la cual depende de sus condiciones como el sexo, edad, estado nutricional, hormonal, inmunodeficiencias (Moreno *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2006; Valencia *et al.*, 2003 y Builes *et al.*, 2009).

La infección por *T. spiralis* ha presentado alteraciones en los tejidos donde se presenta, como lo son reacciones de hipersensibilidad inmediata y producción de anticuerpos, generando una protección específica (Moreno *et al.*, 2008).

Los anticuerpos se producen como respuesta a la detección de moléculas extrañas a un organismo, las cuales se encuentran distribuidas en todos los fluidos orgánicos de los vertebrados y en las membranas de los linfocitos B y células plasmáticas.

La placenta es un órgano vascularizado formado durante el embarazo a partir de la membrana que rodea al feto. En las hembras fecundadas del modelo murino la placenta es de tipo hemoendotelial.

La placenta constituye una barrera a la mayor parte de las moléculas proteicas grandes e inmunoglobulinas entre la madre y el feto, sin embargo la IgG se transfiere de la madre al producto y es en algunas especies animales como primates y roedores un medio importante para la transferencia de protección inmunológica; en el estudio de Moreno y colaboradores, se detectó la presencia de IgG policlonal por inmunoelectrotransferencia en dilución de 1:100 y posterior a los dos meses continuaron positivos hasta los 8 meses (Moreno *et al.*, 2008).

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La trichinellosis es una zoonosis reemergente a nivel mundial que es transmitida al hombre por el cerdo, perro, jabalí, oso y otros mamíferos, de la cual no se realiza diagnósticos de manera habitual y por tal motivo sus huéspedes son susceptibles a una segunda infección y los cuales por primera infección generan memoria inmunológica, permitiendo que exista una respuesta inmediata ante la re-infección y sea menor el grado de reacción ante la infección.

En estudios anteriores se ha encontrado que existe paso de anticuerpos de clase IgG los cuales fueron detectados en productos de 8 meses de edad (Moreno *et al.*, 2008).

Por esta razón se evaluó si el paso de anticuerpos maternos al producto le confiere protección ante una re-infección y si la protección generada es la misma con las diferentes cargas parasitarias y en los dos modelos murinos.

ANTECEDENTES

Las primeras observaciones de quistes de *Trichinella* fueron realizados en músculos procedentes de autopsias de cadáveres humanos en el hospital Guy de Londres por Peacock en 1828 y por Hilton en 1833 sin que llegaran a establecer la naturaleza del agente. El crédito del descubrimiento del parásito de *Trichinella* se debe a James Payer, estudiante de medicina que en el Hospital San Bartolomé de Londres observó que en los músculos de un hombre que había muerto de tuberculosis tenía en el diafragma unas manchas blanquecinas que no se presentaban en los otros cadáveres. Al ver al microscopio aquellas manchas, Payer vio que estaban formadas por unos gusanillos enrollados en espiral e incluidos en unas membranas. Richard Owen que estudió porciones del músculo del caso de Payer, describió el parásito al cual denominó *Trichina spiralis* en 1835 (Moreno *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2007; Builes *et al.*, 2009; Reveles *et al.*, 2011).

Elidí (1846) encontró idénticos gusanillos enquistados en la carne de algunos cerdos y los considero como de la misma especie que los antes hallados en el hombre Italiano. Leuckart (1853) y Virchow (1859) demostraron el ciclo biológico de *Trichina spiralis* en animales de laboratorio. Zenker (1860) puso de manifiesto la importancia médica sanitaria de la trichinellosis. Algunos años después varios investigadores alemanes revelaron la manera como el hombre se infecta con este nematodo (Sánchez *et al.*, 2006).

Primeramente fue descrito y denominado *Trichina spiralis*, pero debido a que el nombre genérico ya había sido utilizado para un género particular de moscas se re-clasificó como *Trichinella spiralis*, fue hasta 1972 que el género *Trichinella* era considerado como específico debido a la ausencia de características morfológicas distinguibles entre las cepas aisladas. En los últimos 10 años en todo el mundo se ha presentado un aumento de esta zoonosis, de la cual solo se hace un diagnóstico cuando existen brotes o es evidente que el parásito está situado en músculo.

Los estudios en México sugieren que la parasitosis se distribuye en la zona centro del país, sin embargo la información actual de la trichinellosis humana no refleja la verdadera situación epidemiológica de la enfermedad parasitaria en México. Sin embargo se tienen antecedentes de brotes epidemiológicos en diferentes entidades de la República Mexicana: Zacatecas, Estado de México, Durango, Sonora, Chihuahua, Jalisco, Michoacán y Ciudad de México (de la Rosa *et al.*, 2011).

El gran impacto que representan las enfermedades transmitidas por los alimentos se pone como un manifiesto ante la aparición de brotes epidemiológicos, en Zacatecas la mayor parte de los brotes ocurridos a la fecha han sido por ingerir chorizo, carne cruda o mal cocida (Chávez *et al.*, 2011; Cox, 2002).

Se ha encontrado que esta enfermedad parasitaria se involucra a roedores del género *Rattus* en el ciclo biológico del mantenimiento y la transmisión de la trichinellosis, también se ha observado que *T. spiralis* infecta e invade los músculos de diferentes mamíferos, entre ellos el perro, la infección se da cuando come carne con larvas infectantes (LI) y presenta un cuadro clínico de infección. En los estados de Zacatecas, Durango, Chihuahua, Guanajuato, Jalisco, Estado de México y el Distrito Federal se han registrado brotes epidemiológicos de trichinellosis. En el estado de Zacatecas el primer brote se registró en 1976 en donde se infectaron 18 personas y 5 de ellas murieron (Berumen *et al.*, 2002).

Taxonomía de *Trichinella*

Anteriormente se conocía a *T. spiralis* como una especie única, pero en diversas áreas geográficas se han descrito *Trichinellas* que aunque morfológicamente llegan a ser iguales, han presentado diferencias en sus características biológicas, Tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía de *Trichinella* spp.

Taxonomía de <i>Trichinella</i> spp.			
Reino: Animalia			
Phylum: Nematoda			
Subclase: Adenophorea	(Aphasmeida)	Aphasmeida	(Chitwood y Chitwood; 1933)
Orden: Enoplida Trichocephalida (Skrjabin y Schulz, 1928), Spassky, 1954			
Súper familia: Trichinellicae			
Familia: Trichinellidae (Ward, 1907)			
Género: <i>Trichinella</i> (Owen, 1835)			
Especies: <i>T. spiralis</i> (Owen, 1835) Railett, 1895)			
<i>T. nativa</i>			
<i>T. britovi</i>			
<i>T. nelson</i>			
<i>T. murrelli</i>			
<i>T. patagoniensis</i>			
<i>T. pseudospiralis</i>			
<i>T. papuae</i>			
<i>T. zimbabwensis</i>			
<i>T6</i>			
<i>T8</i>			
<i>T9</i>			

(de la Rosa *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2006; Krivokapich *et al.*, 2012; Pozio, 2014).

Actualmente a partir de datos procedentes de estudios moleculares se identifican 12 genotipos, 9 de estos son reconocidos específicamente con 6 especies encapsuladas que infectan solo a mamíferos (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. britovi*, *T. murreli* y *T. patagoniensis*), 3 no encapsuladas que infectan mamíferos y 3 no encapsuladas que infectan mamíferos y aves (*T. pseudospiralis*) o mamíferos y reptiles (*T. papuae*, *T. zimbabwensis*), a continuación en la tabla 2 observamos las diferentes especies, su distribución y a los animales que infectan (Krivokapich *et al.*, 2012; Pozio *et al.*, 2009; Pozio, 2014).

Tabla 2Especies y genotipos de *Trichinella* identificados, distribución y hospederos

Especies y Genotipos	Formación de célula nodriza en músculo	Distribución	Hospedero
<i>T. spiralis</i>	Si	Regiones templadas y tropicales, cosmopolita	Carnívoros silvestre, omnívoros cerdo, rata, caballo
<i>T. nativa</i>	Si	Región nórdica, Norte América, Norte de Europa y Asia	Carnívoros silvestres
<i>T. britovi</i>	Si	Zonas templadas de Asia y Europa	Carnívoros silvestres,
<i>T. Nelson</i>	Si	Zona ecuatorial de África	Carnívoros
<i>T. murrelli</i>	Si	Norte América	Carnívoros silvestres, caballo
<i>T. patagoniensis</i>	Si	Argentina	Carnívoros silvestre, omnívoros cerdo, rata, caballo y pumas
<i>T. pseudospiralis</i>	No	Europa, Australia, Norte América y Asia	Mamíferos y aves
<i>T. papuae</i>	No	Nueva Guinea	Cerdos
<i>T. Zimbabweensis</i>	No	África	Reptiles, mamíferos
<i>T6</i>	Si	Sur de Canadá, Norte América	Carnívoros
<i>T8</i>	Si	África subtropical	Carnívoros
<i>T9</i>	Si	Japón	Carnívoros

(de la Rosa *et al.*, 2011; Builes *et al.*, 2009; Gottstein *et al.*, 2009; Krivokapich *et al.*, 2012; Pozio, 2014).

Morfología y estructura

El parásito de *T. spiralis* es de forma cilíndrica y de vela delgada en ambas porciones, es un parásito propio de zonas geográficas templadas, para éste parásito se identifican 3 estadios: estado adulto (HA), larva recién nacida (LRN) y larva de músculo enquistada o larva infectante (LI) (Despommier *et al.*, 2005; de la Rosa *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2009; 2012).

Las LI enquistadas en músculo son hialinas, se encuentran enrolladas en espiral en lo que se conoce como célula nodriza, que mide de 300 a 400 μm de largo por 150 a 200 μm de ancho, del enrollamiento típico de la LI se deriva el nombre específico; tiene vaina elipsoidal que las cubre, su eje longitudinal es paralelo a las fibras musculares y están rodeadas por una reacción celular (Moreno *et al.*, 2009). En el interior de estas células, el parásito no permanece inmóvil, sino que realiza los lentos movimientos anteroposteriores y su extremidad anterior oscila constantemente como explorando el microambiente que lo rodea como se observa en la figura 1, donde se presentan las partes morfológicas características del parásito en la etapa en la que se encuentra latente para reproducir su ciclo vital.

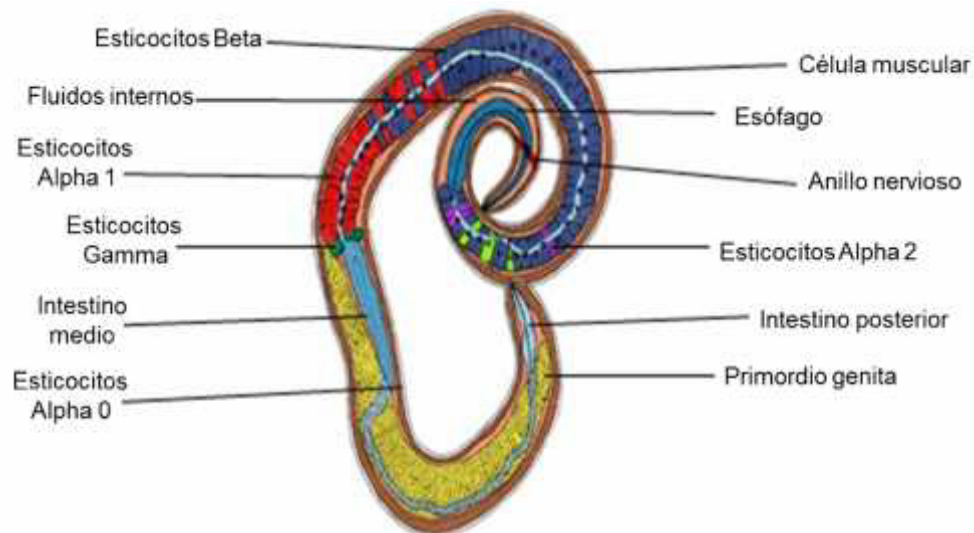


Figura 1. Morfología de la larva infectante de *T. spiralis* (Despommier y Chen, 2012).

Anatómicamente *T. spiralis* está constituida por dos estructuras, el tubo externo formado por la cutícula y el interno por el esófago. Entre estas dos estructuras se encuentra el

espacio pseudocelómico. El esófago en su parte posterior que es glandular, se encuentra constituido por esticosomas, los que corresponden a glándulas exocrinas constituidas entre 45 a 55 esticocitos, cuyos productos antigénicos se descargan hacia la luz del esófago y de ahí al exterior del parásito. Los esticocitos no son más que las células discoides que tienen 5 tipos de gránulos citoplásmicos y se dividen en: 0, 1, 2, y de acuerdo al tamaño de polipéptidos que secretan (los alfa secretan polipéptidos mayores de 50 a 55 kDa y los beta un polipéptido de 48 kDa). Estos secretan material antigénico en las primeras 30 horas post-infección y son capaces de inducir una respuesta inmune (Despommier y Chen, 2012).

Los adultos son gusanos pequeños y delgados con tono blanco cremoso, el macho mide entre 1.4 a 1.6 mm de longitud por 40 a 60 μm de ancho, sus extremidades anterior y posterior son delgadas; se le identifica cuerpo cuticular o cutícula abierta, abertura oral, anillo nervioso, esticosomas, intestino medio, intestino posterior y cloaca en la última porción, vesículas seminales, además de dos pares de papilas genitales, tiene un solo testículo, por lo que es monorquideo y con espermatozoides no flagelados y de 2 a 3 cromosomas (figura 2) (Despommier y Chen, 2012).

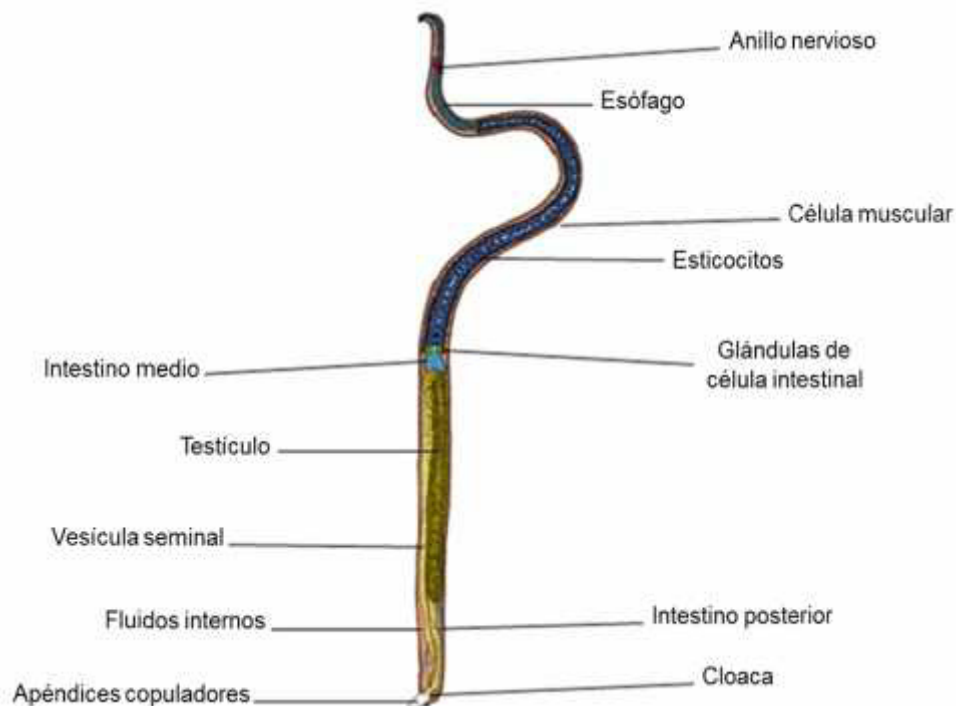


Figura 2. Morfología del macho adulto (AM) de *T. spiralis* (Despommier y Chen, 2012).

La hembra mide aproximadamente 3 mm de largo por 30 a 36 μm de ancho. La porción anterior termina en una punta y la posterior es más ancha, la vulva se abre en un cuartil de distancia del extremo anterior, en la porción ventral; la vagina se extiende en la parte posterior hasta el útero, que contiene en su porción anterior larvas y huevos; en la región posterior atrás del útero y cerca de la abertura anal, se encuentra el ovario que produce óvulos con 3 cromosomas; es epistodelfa, por presentar sus genitales en la parte posterior del cuerpo (figura 3). Las células somáticas de las hembras tienen 6 cromosomas y las de los machos 5 (Chávez *et al.*, 2011; Despommier y Chen, 2012).

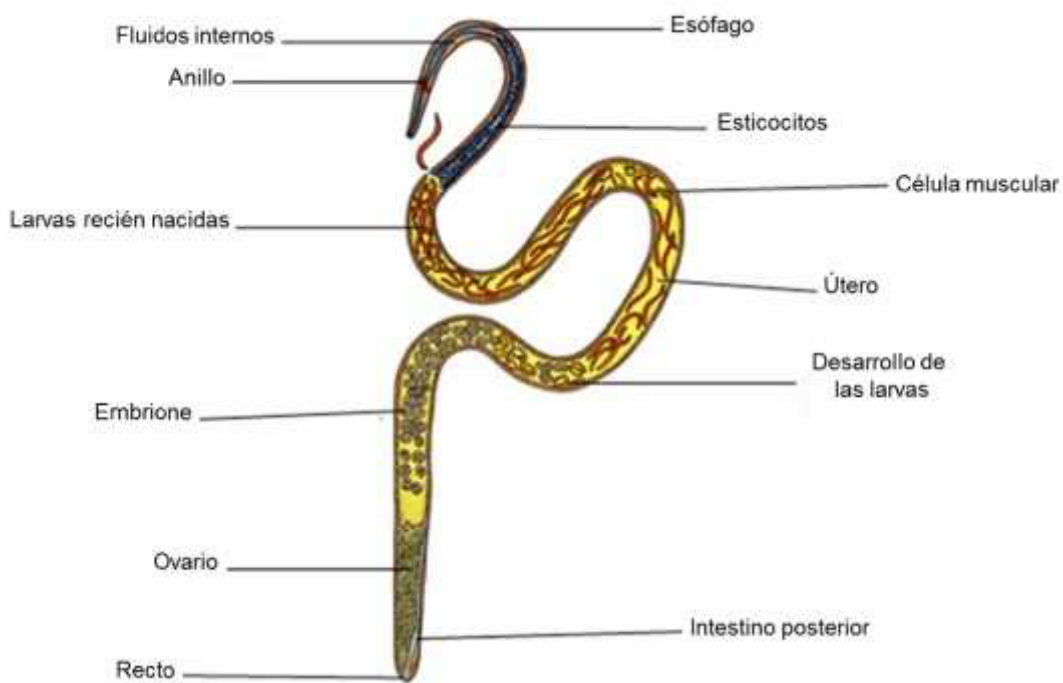


Figura 3. Morfología de la hembra adulta (AH) de *T. spiralis* (Despommier y Chen, 2012).

Las larvas recién nacidas (LRN) miden 120 μm de longitud por 7 μm de diámetro y tienen un conjunto de células, quizá germinales pero no órganos, las LRN representan la fase de invasión de músculo. Se piensa que las LRN poseen un estilete en la parte anterior del esófago con el cual penetra a las células musculares ya que el sitio de penetración muestra rasgos de desorganización como si se tratara de un proceso mecánico. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que la penetración de las LRN de *T. spiralis* se lleve a cabo por medio de procesos enzimáticos (Sánchez *et al.*, 2006).

Epidemiología y Distribución geográfica mundial de *Trichinella*

Aproximadamente 4 millones de personas en todo el mundo están infectadas por parásitos helmintos, lo que representa un gran problema sanitario y económico a nivel mundial (Van Die y Cummings, 2009; Muñoz, 2013).

Los gusanos nemátodos del género *Trichinella* son uno de los patógenos zoonóticos más extendidos en el mundo. La infección por *Trichinella spp.* se ha detectado en animales domésticos y salvajes de todos los continentes, con la excepción de la Antártida, donde no existe un registro de la parasitosis (Laverde *et al.*, 2009; Pozio *et al.*, 2013).

Esta distribución global de *Trichinella*, junto con diferentes hábitos alimenticios culturales, representa los principales factores que favorecen las infecciones humanas en los países industrializados y no industrializados. Cambios políticos y económicos importantes, las revoluciones y guerras pueden contribuir al aumento de la prevalencia en la población humana.

Un número limitado de países ha implementado un sistema de registro oficial de las infecciones en humanos y animales en los últimos 50 años. En la mayoría de los países, los informes de la infección han sido y sigue siendo de carácter voluntario y se basa en los médicos, veterinarios, biólogos, zoólogos o los epidemiólogos que trabajan en estos parásitos (Bruschi, 2012).

La presencia de la trichinellosis en humanos se ve estrechamente relacionada con las prácticas culturales de alimentos, incluyendo el consumo de carne cruda o poco cocinada de origen animal diferente (Pozio, 2007).

El género de *Trichinella* spp. se encuentra en la mayoría de los ambientes con excepción del desértico (figura 4).



Figura 4. Distribución geográfica mundial de las especies de *Trichinella* (Gottstein *et al.*, 2009; Bruschi, 2012; Krivokapich *et al.*, 2012; modificado por de Avila de Muñoz 2013).

Epidemiología y Distribución geográfica en México

Trichinellosis humana se presenta en México a partir del consumo de carne de cerdos domésticos. Según la información publicada existen 766 infecciones con 14 muertes que fueron documentadas entre 1952 y 1997. Se ha subestimado probablemente el número de infecciones como lo sugiere un estudio serológico el 1.9% de las 954 muestras de suero recogidas al azar en una zona rural en el año 1997 fueron positivas (Pozio, 2007). La investigación epidemiológica en México relacionada con la trichinellosis indica que tiene una frecuencia de hasta el 8.1% en la población general, por lo que se considera un problema de salud pública, en general se considera una enfermedad con baja prevalencia, pero con mortalidad potencial (Cervera *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2011). Se tienen antecedentes de brotes epidemiológicos en 22 estados de la República Mexicana (Reveles *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012), registrando mayor frecuencia de brotes los Estados de Jalisco, México, Chihuahua y Zacatecas (Chávez *et al.*, 2011; Muñoz, 2013 y Maldonado *et al.*, 2015).

La infección por *Trichinella spp.* También está presente en perros y gatos domésticos y callejeros y en ratas sinantrópicas que viven cerca de focos de infección porcina. *T. spiralis* se detectó en caballos sacrificados en el Estado de México. No se dispone de información sobre la infección de *Trichinella spp.* en la fauna mexicana (figura 5).



Figura 5. Distribución geográfica de *T. spiralis* en México (Chávez *et al.* 2006; Reveles *et al.*, 2011; modificado por de Avila de Muñoz 2013).

Epidemiología y Distribución geográfica en el Estado de Zacatecas

El estudio de la trichinellosis en el estado de Zacatecas inició en los años 70's. Zacatecas es considerado zona endémica del padecimiento. De tal manera, que en los últimos años se han realizado estudios epidemiológicos, donde se ha detectado la presencia de *T. spiralis* en perro, cerdo y rata doméstica, los cuales son hospederos que permiten su permanencia como una zoonosis (Moreno *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2011; Reveles *et al.*, 2011; Muñoz, 2013).

El primer brote diagnosticado en el estado de Zacatecas fue en 1975; posteriormente hubo varios brotes, uno se dio en Laguna del Carretero, municipio de Villanueva en 1976 en donde se registraron 8 defunciones que destacó por su magnitud y letalidad (31%). En un estudio de 1978 a 1988 se registraron 166 casos en 17 brotes

diagnosticados clínica e histológicamente, 15 de ellos llamaron la atención los de Valparaíso donde ocurrió una defunción, así como en Pozo de Gamboa donde, provocó un aborto en una mujer de 20 años (Chávez *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012).

El grupo de edad más afectado comprende entre los 15 y los 44 años y es más recurrente en el sexo femenino. En Zacatecas siete de los 56 municipios que han reportado casos, corresponden al 12%; entre ellos figuran Zacatecas, Villanueva, Valparaíso, Pánuco, Jerez, Jalpa y Guadalupe; el grado de afección corresponde al orden en que se mencionan; el mecanismo de transmisión, en la mayor parte de los casos, fue por la ingesta de carne de cerdo cruda o mal cocida. El diagnóstico se confirmó mediante pruebas clínicas, por el estudio anatomopatológico y por microinmunodifusión. Del estudio de trichinellosis, hecho en cerdos de los rastros municipales de Zacatecas, Jerez y Ojocaliente, se obtuvieron 85 muestras, las cuales fueron analizadas por compresión en placa y digestión artificial, también 950 sueros de cerdos vivos, 250 y 700 de granja de patio, sueros que fueron sometidos a microinmunodifusión (Chávez *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2015).

Se realizó un estudio en el Estado de Zacatecas que muestra que la zoonosis causada por *T. spiralis* sigue siendo una enfermedad endémica en el Estado, el estudio se realizó utilizando 4699 sueros de población general que asistió a los centros de salud del Estado sin signos ni síntomas de infección por *T. spiralis*, los sueros fueron llevados al Laboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas donde se aplicaron técnicas indirectas como MIDD, Dot-ELISA y Western Blot, mediante las cuales se confirmó la presencia de anticuerpos Anti-*T. spiralis* en sueros de pacientes de Calera, Zacatecas y Guadalupe (Maldonado *et al.*, 2015).

La figura 6 muestra los municipios del Estado de Zacatecas donde se han registrado brotes de trichinellosis por el consumo de carne infectada con *T. spiralis*.

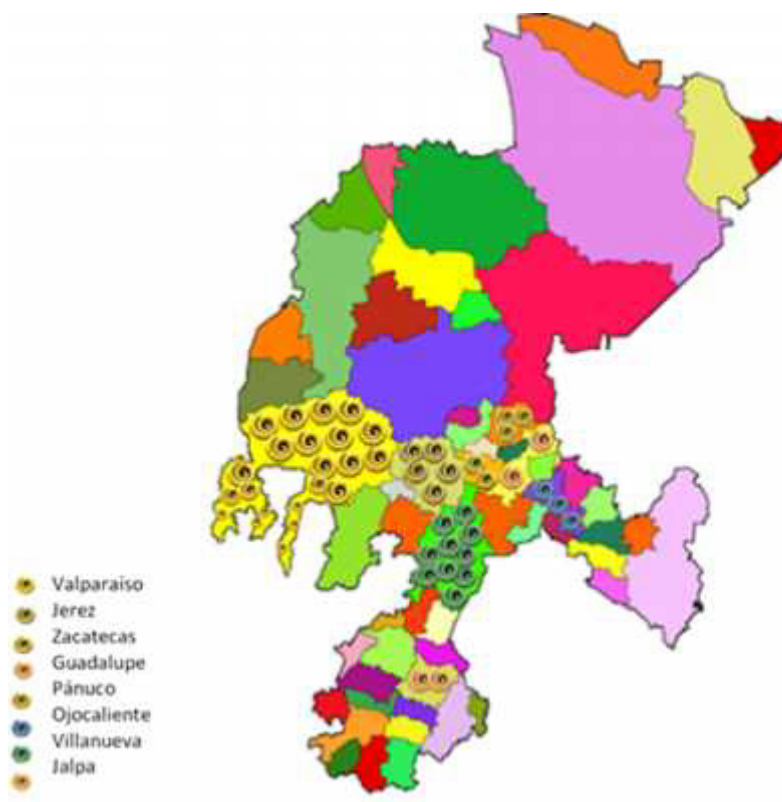


Figura 6. Distribución geográfica de *T. spiralis* en Zacatecas (Chávez *et al.* 2006; modificado por de Avila de Muñoz 2013).

Ciclo de vida de *T. spiralis*

La principal característica de la epidemiología de *T. spiralis* es su transmisión obligatoria por ingestión de carne. Una segunda característica cardinal es la existencia de dos sistemas ecológicos normalmente separados, el silvestre y el doméstico (Muñoz, 2013; Pozio, 2014).

El ciclo de vida doméstico se desarrolla en sus diferentes estadios a nivel enteral, parenteral y muscular, el ciclo se inicia en el hospedero cuando son ingeridas las LI del parásito, presentes en los quistes de la carne cruda o insuficientemente cocida; las LI son liberadas por la digestión gástrica; posteriormente las LI liberadas pasan al intestino delgado, en donde, a través de una serie de mudas, se diferencian sexualmente y alcanzan el estado adulto entre las 29 y 36 horas después de la infección, los machos

miden de 1.4 a 1.6 mm y las hembras 3-4 mm. La cópula se inicia aproximadamente a las 40 horas de que se ha alcanzado el estado adulto y puede persistir hasta el decimotercer día (figura 7) (Moreno *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2011; Muñoz, 2013; Mitreva y Jasmer, 2006; Bruschi, 2012).

Las hembras grávidas penetran a las glándulas de Lieberkühn; perforan la mucosa y llegan a los espacios linfáticos, donde dan nacimiento a las LRN. Se estima que una sola LI en su periodo de vida, de aproximadamente seis semanas, puede producir de 1000 a 10 000 LRN, y desde el principio de la primera semana hasta el fin de la sexta puede ser producida una LRN cada media hora (Moreno *et al.*, 2009). La hembra genera nuevas LRN que atraviesan la pared intestinal y se diseminan por el organismo del huésped hasta alcanzar su localización definitiva en el tejido muscular estriado. La migración de las LRN puede causar serias lesiones, particularmente si atraviesan el corazón o el cerebro. Las LRN inducen cambios en las fibras musculares que terminan desarrollando una capsula aislante y protectora de las agresiones inmunológicas del huésped y de los compuestos terapéuticos (figura 7). Las LI miden aproximadamente 11,00 mm (Steffan Pedro, 2006).

Después de la cópula los machos mueren y lo mismo ocurre con las hembras después de la puesta de las LRN, siendo digeridos los parásitos por los jugos digestivos. Algunas LRN y adultos en el intestino son expulsadas con las heces, constituyendo una fuente de infección poco frecuente.

Las LRN pasan a circulación general y se diseminan por todo el organismo donde son más numerosas entre los ocho y veinticinco días después de la infección; finalmente son distribuidas en los músculos esqueléticos donde penetran el sarcolema de las fibras y se desarrollan en éstas; se diferencian sexualmente, alcanzando un tamaño de 800 a 1 000 micras de largo por 30 micras de ancho, aproximadamente a los dieciséis días, la cronología se muestra en la tabla 3 (Mitrevá y Jasmer, 2006; Moreno, *et al*, 2009).

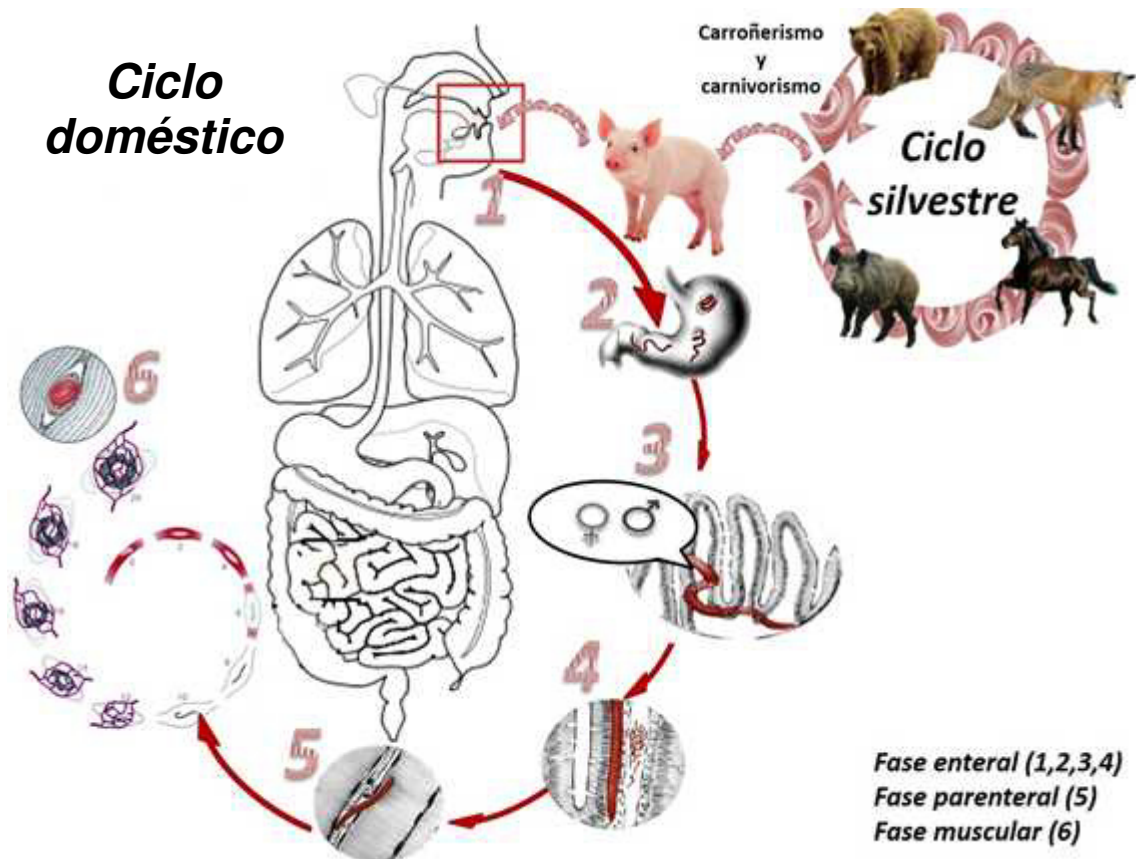


Figura 7. Ciclo de vida de *T. spiralis* (Muñoz, 2013; modificado por de Avila de http://www.trichinella.org/bio_lifecycle.htm)

Tabla 3Ciclo de *T. spiralis*, cronología en el huésped.

Fase del parásito	Etapas en el huésped	Tiempo	Manifestaciones
Larvas infectantes	Ingestión del quiste	0 horas	
	Digestión del quiste	4 – 24 horas	
Adultos	Diferenciación sexual de las LI	1ro – 2 do día	Síntomas gastro-intestinales
	Copulación y fertilización de las hembras	3er día	
	Localización de las hembras en la mucosa intestinal Iniciación de la larviposición	5to – 6to día	
Larvas migratorias y enquistadas	Penetración de las LRN en la mucosa intestinal; paso a los linfáticos y al torrente sanguíneo	7mo día	
	Distribución en los músculos esqueléticos	8vo – 9no día	Síntomas musculares
	Máxima invasión de los músculos esqueléticos	10mo – 12vo día	
	Disminución de la larviposición	14vo – 16vo día	Iniciación de la eosinofilia
	LI en músculo pero no enquistadas	17vo – 24vo día	La eosinofilia alcanza su máximo. Prueba intradérmica inmediata positiva.
	La sangre libre de LRN	25vo – 29vo día	Síntomas respiratorios.
	Se completa el enquistamiento	1 – 2 meses	Prueba de precipitación.
	Periodo máximo de vida de las hembras fecundadas en el tracto intestinal	3 – 5 meses	Síntomas neurotóxicos y posible miocarditis.
	Iniciación de la calcificación de los quistes	6 – 11 meses	Convalecencia
	Se completa la calcificación de los quistes	1 – 5 años	
	Posiblemente algunas LI son viables.	6 años en adelante	

(Moreno *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2011; Bruschi, 2012, Muñoz, 2013).

En las fibras musculares finalmente las LI experimentan un proceso de encapsulación o enquistamiento, formándose alrededor de ellas una cápsula elipsoide de aproximadamente 400 a 600 micras de largo por 250 micras de ancho; su formación se realiza en cerca de tres meses, y los quistes se empiezan a calcificar entre los seis y nueve meses, pero las LI que los contienen pueden permanecer viables durante varios años, los principales músculos estriados donde se alojan las LI son los de mayor actividad tales como: el diafragma, maseteros, intercostales, oculares, músculos de la lengua y de miembros anteriores y posteriores (Gottstein *et al.*, 2009; Laverde *et al.*, 2009).

Infectividad

El nivel de infectividad de *T. spiralis* está en relación con el número de parásitos que se establecen en el hospedero con el grado de inmunidad, con los caracteres del hospedero y de la cepa infectante. En la especie humana la ingestión de 2 000 LI ocasiona por lo general la trichinellosis al término de uno a treinta días y una dosis infectante de una LI por gramo es capaz de inducir trichinellosis clínica.

Se han observado variaciones en la infectividad de las cepas de *T. spiralis* aisladas de animales silvestres para los animales de laboratorio; en comparación con la infectividad para éstos de las cepas aisladas de animales domésticos; en Alaska se aisló una cepa de *T. spiralis* del oso polar que no se desarrolló en la rata, y por el contrario una cepa aislada del cerdo se desarrolló fácilmente (Battistoni *et al.*, 2015). En Kenia, África, se aisló de la hiena moteada (*Crocuta crocuta*) una cepa con infectividad reducida para la rata y el cerdo, y del gato serval (*Felis serval*) una cepa con baja infectividad para la rata, en comparación con las cepas aisladas del gato en la Gran Bretaña y del cerdo en Polonia.

En Italia se ha estudiado una cepa que no infecta con facilidad a los roedores, pero que es prevalente en zorros y perros. En la Unión Soviética se aisló una cepa de *T. spiralis* a partir del zorro, que mostró menor infectividad para el ratón que las cepas aisladas del cerdo.

Otra cepa aislada en Calcuta del gato civeta puede por sus caracteres ser diferente de otras cepas aisladas en diferentes regiones del mundo.

En opinión de Kozar y Kozar (1965), la baja infectividad de la cepa africana de Kenia, aislada de la hiena, no es constante ya que la infectividad se puede incrementar por pases en el ratón.

Por las diferencias observadas en las cepas de *T. spiralis* aisladas en diversas áreas geográficas y en diferentes especies animales, ya no es posible generalizar sobre la epidemiología de la trichinellosis basándose sólo en observaciones realizadas en la zona templada, ya que pueden existir varias razas geográficas del parásito, cada una adaptada a un complejo particular de animales carnívoros y las variaciones en la infectividad de cualquier cepa para la especie humana son de importancia en la epidemiología de la enfermedad.

Viabilidad

Las LI encapsuladas y enquistadas de *T. spiralis* pueden permanecer viables por varios años en los músculos de los hospederos, en el hombre se han registrado periodos de viabilidad de 24, 31, 38 y hasta 40 años, y en el cerdo se han encontrado LI viables después de once años (Ramírez, 1981).

Después de la muerte del hospedero, las LI en los quistes pueden sobrevivir de dos a tres meses y en temperaturas ambientales comprendidas entre 18 y 25 °C hasta por 260 días, aunque el músculo que las contiene esté putrefacto. Chávez en el 2007, mostró que la carne frita a 450 °C hasta el minuto 60 muestra viabilidad positiva, en refrigeración a 4°C analizada del día 0 al día 120, la viabilidad se observa positiva demostrando que las características físicas no muestran alteraciones, en el proceso de congelación a -20 °C, -40 °C y -50 °C al día 30 se observó una viabilidad negativa con alteraciones en la estructura del parásito, las muestras que se metieron en el microondas a temperatura media en un tiempo de 10, 20 y 30 minutos tienen viabilidad positiva y la carne que se

puso a cocción en la olla de presión a los 30 minutos muestra una viabilidad negativa (Chávez *et al.*, 2007).

Aspectos inmunológicos

La infección por *T. spiralis* ha presentado alteraciones en los tejidos donde se presenta, como lo son reacciones de hipersensibilidad inmediata y producción de anticuerpos, generando una protección específica (Moreno *et al.*, 2008)

Los huéspedes de *Trichinella* adquieren una inmunidad sólida que se dirige especialmente contra los vermes adultos, las LRN migrantes y las LI. Los adultos y la actividad temprana de las LRN impactan principalmente sobre la inmunidad de la mucosa intestinal y la circulación de las LRN en sangre o linfa y la LI evoca una inmunidad sistémica.

Los antígenos de *T. spiralis* adquieren una división en base al tiempo que tardan en presentar alguna reacción en el huésped, lo cual hace que esta división forme dos grupos: a) grupo I o antígenos tempranos, que son aquellos que inducen respuesta luego de la 2da semana y b) grupo II o antígenos tardíos, van a ser los que son detectados a partir de la 4ta-5ta semana (Riva *et al.*, 2007).

Las tres fases evolutivas de *T. spiralis* estimulan una respuesta inmunológica distinta en el hospedador ya que presentan diferencias en la composición antigénica de la cutícula y de las secreciones, así como una distinta localización (Laverde *et al.*, 2009).

La respuesta inmune que es desencadenada durante la infección parasitaria por *T. spiralis* es esencialmente de naturaleza celular. La forma de cómo se presentan estos eventos se puede describir en tres fases (Gottstein *et al.*, 2009) de la siguiente manera:

a) En la fase intestinal

- 1) Al comienzo de la infección las actividades físicas y bioquímicas del parásito en el tejido huésped provoca una respuesta de fase aguda con acumulación de poblaciones celulares de macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Gottstein *et al.*, 2009).
- 2) Los antígenos parasitarios provocan y estimulan la formación de linfocitos Th (T helper) y Th2, generando citoquinas cuya acción resulta en una infiltración con neutrófilos, macrófagos, linfocitos B y mastocitos alrededor del parásito. Las citoquinas secretadas por los Th2 generan un infiltrado rico en mastocitos (IL-4 y 9) y eosinófilos (IL-5). La producción local de anticuerpos anafilácticos (IgE en humanos, IgG1 en ratones e IgG2 en ratas) es estimulada por la IL-4 (Riva *et al.*, 2007; Rogerio y Anibal, 2012).
- 3) Los mastocitos promueven el aumento de permeabilidad en el epitelio intestinal participando así en la eliminación de adultos intestinales al ser activados por la IgE, en ratas se ha observado la intervención de la IgA secretoria en este evento. También se produce la atracción de más eosinófilos, neutrófilos y macrófagos, generándose un ambiente bioquímicamente inhóspito que determina la expulsión del parásito. Se demostró que la eosinofilia en ratas comienza a desarrollarse de 9 hasta 20 días después de la infección y en el hombre puede ocurrir a los 7 días o tardarse hasta la 5ta o 6ta semana después de la infección (Gottstein *et al.*, 2009; Riva *et al.*, 2007).

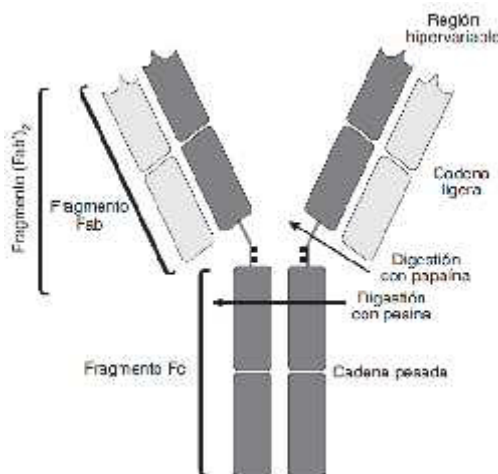
b) En la fase de migración y de infección muscular

La respuesta inmunitaria contra las LRN tiene que ver con la presencia de anticuerpos contra antígenos de superficie, estos anticuerpos son capaces de mediar una acción citotóxica. Se ha demostrado que las LRN se adhieren con fuerza a las células de la lámina propia, lo que reduce la supervivencia del parásito (Riva *et al.*, 2007).

En el hombre se han reportado alteraciones cardiovasculares, pulmonares y oculares debidas a la detención transitoria de las LRN de *T. spiralis* por dichos órganos. Estudios posteriores demostraron que existía migración transplacentaria en ratas y ratones gestantes. Webster & Kapel (2005) demostraron la transmisión vertical de *Trichinella* en animales carnívoros y roedores siendo posible la asociación con el nivel de infección en las madres (Riva *et al.*, 2007).

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que indicó Porter en 1959, están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas, dependiendo del tipo de inmunoglobulina, en una o varias unidades estructurales básicas (Mamani *et al.*, 2011; Sanabria *et al.*, 2007).

Cada unidad está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente (figura 8).



25

b) Características de los distintos tipos de inmunoglobulinas

Debido a esta distinta estructura, las cadenas pesadas van a presentar distintas propiedades biológicas, como es la capacidad de unirse entre sí, fijar complemento, fijar la pieza de secreción y unirse a macrófagos, neutrófilos y células NK.

c) Distribución de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas se encuentran distribuidas en todos los fluidos orgánicos de la economía de los vertebrados y en las membranas de los linfocitos B y células plasmáticas. Las cantidades relativas de cada una de las clases de inmunoglobulinas en los diferentes compartimentos del organismo son muy diferentes. En el torrente sanguíneo predomina la IgG mientras que en las secreciones (saliva, lágrimas, secreción bronquial, así como en el líquido cefalorraquídeo y mucosas) la IgA es la predominante.

Los niveles de inmunoglobulinas séricas fluctúan ampliamente en función de diversos aspectos, tales como el estado nutricional, la edad, etc. (Ayala *et al.*, 2007).

d) Propiedades y función de cada una de las inmunoglobulinas

Inmunoglobulina G (IgG)

Son las inmunoglobulinas más abundantes y representan más del 70 % de las Igs séricas totales; las diferentes subclases se presentan en proporciones muy diferentes. La IgG₁ es la subclase más frecuente (más del 60 %), seguida de la IgG₂ (aproximadamente un 18 %), mientras que IgG₃ e IgG₄ se encuentran en mucha menor proporción (Peña, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Mamani *et al.*, 2011).

Esta inmunoglobulina posee capacidad neutralizante, precipitante, de fijar complemento, de unirse a células NK y a macrófagos (opsonización) y son capaces de atravesar activamente las membranas biológicas. La propiedad de atravesar activamente las membranas biológicas es de sumo interés por lo que, además de ejercer esta inmunoglobulina, su efecto en toda la “economía del organismo”, lo hace también en el feto al atravesar la placenta desde la madre, merced a la existencia de receptores para la

porción Fc en el sincitio trofoblasto (Peña, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Mamani *et al.*, 2011).

Como el feto sólo sintetiza pequeñas cantidades de inmunoglobulinas, adquiere de este modo la posibilidad de defensa, no solamente mientras se encuentra en el seno materno, sino incluso durante la lactancia, período en el cual todavía no ha desarrollado la capacidad total de síntesis de inmunoglobulinas. Sin embargo, este paso de IgG desde la madre al feto no siempre es beneficioso para el feto (Peña, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Mamani *et al.*, 2011).

Inmunoglobulina M (IgM)

Los anticuerpos del tipo IgM son los que más rápidamente se forman en respuesta a un estímulo antigénico, esta inmunoglobulina se caracteriza también por poseer capacidad neutralizante, precipitante, aglutinante, fijar complemento, activar la respuesta inmune, sin embargo no atraviesa activamente las membranas biológicas. Esta última propiedad hace que esta inmunoglobulina ejerza su acción normalmente en los espacios intravasculares. Representa del 5 al 10 % de las Igs séricas totales y junto a la IgD es la más frecuentemente encontrada en la superficie de los linfocitos B como inmunoglobulina de membrana (Peña, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Mamani *et al.*, 2011).

Inmunoglobulina A (IgA)

Esta inmunoglobulina posee capacidad neutralizante y precipitante, mientras que su capacidad de fijar complemento y de opsonización son muy débiles, limitándose su efecto a neutrófilos y no a macrófagos.

La propiedad más importante de esta inmunoglobulina viene determinada por su capacidad de unirse por el extremo Fc a la pieza secretora, gracias a la cual puede ser secretada por las mucosas y glándulas exocrinas, ejerciendo su acción más importante en la superficie de mucosas y líquidos biológicos (sobre todo IgA₂), tales como el líquido cefalorraquídeo, secreción bronquial, lágrima, saliva, etc. Esto es importante porque así protegen precisamente los puntos más vulnerables del organismo, esto es, las puertas de

entrada al mismo, como son ojos, boca, aparato digestivo, sistema respiratorio, vagina, etc. Esta inmunoglobulina también es encontrada en la leche materna. Los niveles de todas las inmunoglobulinas, a excepción de la IgG en recién nacidos son muy bajos, siendo por tanto de gran significación el hecho de que la IgA se transfiera desde la madre al lactante a través de la secreción láctea (Peña, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Mamani *et al.*, 2011).

Inmunoglobulina D (IgD)

La concentración de esta inmunoglobulina en suero es muy baja. Hasta fechas muy recientes no se había demostrado que esta inmunoglobulina poseía capacidad de unirse a antígenos, por lo que se dudaba de que actuase con función de anticuerpo. Sin embargo, aunque actualmente se ha demostrado su acción de anticuerpo, no se conoce con precisión cuáles son sus funciones específicas, aunque se piensa que colabora de forma importante en la activación de linfocitos B al actuar como receptor en la superficie de los mismos (Peña, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Mamani *et al.*, 2011).

Inmunoglobulina E (IgE)

La inmunoglobulina E es una clase de anticuerpo que se denomina así debido a que parte de su estructura está formada por unas cadenas llamadas *Epsilon*. Esta inmunoglobulina se encuentra en sangre en una concentración muy baja a diferencia de las demás inmunoglobulinas. A pesar de ello, suele ser el anticuerpo más importante en la resistencia y lucha contra las enfermedades parasitarias, sobre todo en las producidas por helmintos. La IgE posee la capacidad de activar unas células que contienen en su interior productos muy tóxicos y sustancias letales, capaces de eliminar a tales parásitos.

En el mundo occidental, gracias a los avances higiénicos han disminuido notablemente las enfermedades infecciosas producidas por parásitos, pero nos encontramos con la curiosa situación de tener un sistema inmunitario capaz de sintetizar anticuerpos IgE y sin enemigos naturales que combatir. Por el contrario, existen sustancias inofensivas o inocuas para la mayoría de las personas, como los pólenes, y sin embargo el sistema inmunitario sintetiza IgE específica frente a ellas (Zubeldia *et al.*, 2012).

En individuos alérgicos esta inmunoglobulina se presenta en grandes cantidades. El estímulo para su síntesis puede proceder de una gran variedad de antígenos, a los que en este caso se conocen como alérgenos, éstos pueden penetrar en el organismo a través de la piel o de las mucosas respiratoria, ocular, del aparato digestivo, etc., así como por inyectables, como es el caso de la penicilina u otros medicamentos. La vida media de la IgE en sangre periférica es de 24-48 horas. No tiene capacidad de atravesar la placenta, por lo tanto, las reacciones de hipersensibilidad inmediata no pueden transferirse de manera pasiva de la madre al feto. Sin embargo, existe una predisposición de tipo familiar a padecer enfermedades de naturaleza alérgica. Esta predisposición parece estar relacionada con una tendencia a producir anticuerpos de tipo IgE en la respuesta secundaria frente a antígenos, en lugar de IgG que sería la respuesta normal en individuos no alérgicos (Peña, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Mamani *et al.*, 2011).

La placenta

La placenta humana es la estructura que se forma al interior del útero para aislar la circulación materna de la fetal, además permite ofrecer nutrientes al feto y lo protege de ciertos agentes nocivos para su crecimiento normal. Además de participar en la procreación, también interviene en la producción de hormonas como lo son la Gonadotropina Coriónica Humana que tiene altos niveles en la fase temprana del embarazo para estimular la continuidad de las hormonas gonadotrópicas, favoreciendo de esta manera la proliferación del endometrio viable para la implantación y desarrollo del embrión (Purizaca, 2009; Rodríguez *et al.*, 2014).

El término placenta parece provenir de un vocablo latino que quiere decir “Torta Circular” y aparentemente fue introducida en 1559 por el médico Realdus Columbus. La placenta es una estructura redondeada en forma de disco de unos 25 cm de diámetro y unos 2.5 cm de grosor hacia el final del embarazo que adosado a la cara interna del útero materno le permite al feto nutrirse mediante la extracción de los elementos necesarios provenientes de la sangre materna. El feto está unido a la placenta mediante el cordón umbilical, que es un conducto vascular encargado de llevar la sangre (con desechos y sin oxígeno) desde él hasta la placenta, para que se haga el intercambio necesario con la

madre y retornar oxigenada y rica en nutrientes hacia éste. El intercambio se da a través de la placenta pero funcionando como una barrera muy efectiva que solo permite el paso de sustancias bien determinadas y sin mezclar la sangre del feto con la de su madre.

La placenta es un órgano que se comporta como un filtro de sangre fetal con múltiples compartimientos que bañados por sangre materna permiten el intercambio entre la circulación materna y la fetal evitando su contacto directo, pero en relación tan cercana e íntima que permiten que las sustancias nutritivas y los desechos sean intercambiados sin inconvenientes. La placenta humana comienza a formarse en la segunda semana de fecundación y se considera que ha adquirido su forma definitiva alrededor del tercer mes, cuando sigue extendiéndose, creciendo y engrosándose, pero ya está delimitada. Está formada por un componente materno (que es una transformación de la membrana uterina) y otra parte de origen fetal (trofoblasto), y su función es poner en relación de intercambio la sangre de la madre y del feto.

Funciones de la placenta.

Nutrición: Permite la alimentación ininterrumpida del feto en desarrollo. Cuando las circulaciones materna y fetal se encuentran (separadas por la placenta) el feto extrae de la sangre materna todos los elementos que le son necesarios para su existencia: oxígeno, aminoácidos, ácidos grasos y glucosa (Roa *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014).

Eliminación de desechos: El feto transfiere a su madre los productos de desecho que se producen por su metabolismo y que no puede eliminar por sí solo (Roa *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014).

Funciones endócrinas: La placenta produce hormonas que permiten la permanencia del embarazo y modifican el metabolismo y las funciones fisiológicas maternas para la subsistencia del feto en crecimiento. La hormona placentaria es la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), que permite el embarazo en sus etapas precoces y de manera secundaria permite detectar un embarazo (Roa *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014).

Tolerancia inmunológica: La placenta y los profundos cambios inmunológicos que imprime el embarazo sobre la madre permiten que el feto no sea atacado por el sistema de defensa de la madre (Roa *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014).

Protección biológica: La placenta se comporta como un excelente filtro que impide el paso de sustancias nocivas, parásitos, virus y bacterias que pudiesen afectar al feto, aunque algunas sustancias y/o enfermedades pueden atravesarla y causarle daños significativos como el alcohol, cigarrillos, fármacos fetotóxicos, rubéola, toxoplasmosis, Infecciones de transmisión sexual (ITS), etc. (Raff, 2000; Roa *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014).

La placenta es un órgano vascularizado formado durante el embarazo a partir de la membrana que rodea al feto. En las hembras fecundadas del modelo murino la placenta es de tipo hemoendotelial, Nuñez *et al.*, en 1999 reportan que en hembras preñadas e infectadas con 2000 LI en placenta y en los productos, encontraron 1 LI por animal en 1 lote de 10 animales y Moreno *et al.*, en el 2008 reportan que en hembras gestantes e infectadas con 1000 LI no se detectaron LRN en la placenta ni en los productos, probablemente debido a la cantidad de LI utilizadas para la infección.

La placenta constituye una barrera a la mayor parte de las moléculas proteicas grandes e inmunoglobulinas entre la madre y el feto, sin embargo la IgG se transfiere de la madre al producto y es en algunas especies animales como primates y roedores un medio importante para la transferencia de protección inmunológica; en el estudio de Moreno *et al.*, en el 2008 se detectó la presencia de IgG policlonal por inmuno electro transferencia a dilución de 1:100 y posterior a los dos meses continuaron positivos hasta los 8 meses.

En humanos se reportó el caso de una mujer que abortó a las 22 semanas de gestación en donde fueron establecidos títulos intermedios de IgM y altos de IgG de anticuerpos anti-*T. spiralis*; la placenta, líquido de la cavidad del cuerpo, tejidos y órganos del feto contaminados contenían 0.02 – 30 LI por gramo de tejido (Dubinský *et al.*, 2001). En otra investigación con un examen inmunoquímico se identificaron LI de *T. spiralis* las

cuales se cree infectaron al feto en estado temprano de desarrollo, condicionando aborto (Moreno *et al.*, 2008; Chávez, 2009).

HIPÓTESIS

Las madres infectadas con *Trichinella spiralis* le transfieren anticuerpos al producto confiriéndoles protección ante la infección primaria por *Trichinella spiralis*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el switch de inmunoglobulinas de la madre, el producto y evaluar si le confiere protección al producto al reto con larvas infectantes de *Trichinella spiralis*.

Objetivos particulares

- I. Identificar la clase de inmunoglobulinas presentes en ratas Long-Evans y ratones Balb/c gestantes infectados con *Trichinella spiralis*.
- II. Identificar la clase de inmunoglobulinas presentes en productos de madres infectadas con *Trichinella spiralis*.
- III. Dar seguimiento de la persistencia de estos anticuerpos por seis meses.
- IV. Evaluar la protección de los anticuerpos maternos ante el reto con *Trichinella spiralis* en los productos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Unidad Académica de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Zacatecas, en el Departamento de Biología Celular y Microbiología y en el Laboratorio L1 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Diseño experimental

El trabajo se realizó en dos modelos experimentales, ratas Long-Evans y ratones Balb/c, de los cuales se utilizaron 24 ratas, 12 hembras y 12 machos, y 24 ratones, 12 hembras y 12 machos de dos meses y medio de edad. Se hicieron 4 grupos de 3 animales y a cada grupo se le pusieron 3 machos para el proceso de fecundación en el cual se hizo el monitoreo de frotis vaginal para verificar la presencia de espermatozoides (Chávez *et al.*, 2010).

La reproducción del ciclo de vida de *T. spiralis* para mantener al parásito se infectaron ratas Long-Evans con 500 LI y ratones Balb/c con 100 LI.

Comprobando la fecundación se infectaron las ratas Long-Evans con 500, 750 y 1000 y los ratones Balb/c con 125, 250 y 500 LI, las cuales fueron los grupos de estudio.

El primer grupo fue el control de gestación, donde se hizo el seguimiento de la gestación, se sacrificaron 3 animales a las dos semanas de gestación para la valoración de presencia del parásito en la placenta por técnicas histológicas.

Se trabajaron 2 grupos experimentales, uno en el que se hizo el seguimiento de nacimiento y toma de muestra de suero cada mes por 6 meses para evaluar la cinética de anticuerpos y el segundo grupo se infectó a la mitad de los grupos de animales y se valoró la respuesta inmune y la carga parasitaria.

Todos los grupos tratados fueron procesados por medio de técnicas directas e indirectas.

Infección del modelo experimental

Para reproducir el ciclo biológico de *T. spiralis* se sacrificó un animal de la cepa Long-Evans que se ha mantenido en conserva en el Bioterio de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, se obtuvo tejido muscular del animal, se molió la carne infectada, se procedió a pesar 0.2 gr de la carne en una balanza analítica y mediante la técnica de compresión en placa se llevó a cabo el conteo de LI con un microscopio óptico de luz para sacar el promedio de LI de *T. spiralis* presentes en la muestra, ya teniendo el promedio de LI por gramo se administró vía oral la muestra de carne con peso correspondiente a las diferentes cargas parasitarias (Reveles *et al.* 2014).

Obtención del suero

Los animales fueron anestesiados con Isoflurano para poder tomar la muestra de sangre por el método de extracción de sangre de seno retro-orbital, utilizando un capilar y depositando la sangre en tubos eppendorf de 2 mL sin anticoagulante. Después se centrifugó durante 10 minutos a 100 rpm, para posteriormente recolectar el suero en tubos eppendorf y se almacenaron a -20° C hasta su uso.

Las ratas se manipularon de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Determinación de eosinofilia

Para la determinación de la eosinofilia se obtuvo una muestra de sangre de los animales en estudio, se realizó un frotis sanguíneo deslizando la muestra sobre toda la superficie de un portaobjetos. Después del frotis se colocaron 2 mL de colorante Wrigth sobre la muestra y se dejó actuar por 7.5 minutos, después se agregó 2 mL de PBS pH 6.4 durante 4.5 minutos y posteriormente se lavó con agua destilada hasta la eliminación de restos del colorante y se dejó secar, finalmente se observó el número de eosinófilos presentes en la muestra al microscopio óptico de luz a un objetivo de inmersión 100x.

Se contó el número de eosinófilos presentes por cada 100 células blancas, tres veces con un total de 300 células blancas y se obtuvo el promedio de las tres lecturas (Muñoz, 2013).

Técnica de compresión en placa

Para la identificación y determinación de LI de *T. spiralis* implantadas en tejido muscular, se obtuvo la carne del tejido muscular estriado (masetero, lengua, diafragma y pierna), cada muestra se coloca entre 2 laminillas y se comprime, ocupando una área de 1 x 5 mm, la cual se observa al microscopio óptico de luz, con los objetivos 4x, 10x y 40x observándose la presencia de células nodrizas (Chávez *et al.*, 2011; Muñoz, 2013). Para la determinación del número de LI de *T. spiralis* implantadas en músculo, se observaron 3 campos en un objetivo de 4x por muestra y se contó el número total de LI presentes por campo, posteriormente se promediaron los tres conteos para obtener el promedio de LI de *T. spiralis* implantadas por muestra en músculo estriado (Laverde *et al.*, 2009; Muñoz, 2013).

Cuantificación de carga parasitaria

El proceso se hizo utilizando muestras del tejido muscular (masetero, lengua, intercostales, diafragma y pierna), y se incubaron a 37°C en un tamíz de tul en forma de saco, suspendido en una solución al 3% de pepsina (10,000 U) y 7% de HCl al 37 % (0.2M) en 500 ml de agua destilada, dentro de un embudo de separación; trascurridas 24 horas se procede a separar el paquete larvario con las LI, que se depositaron en el fondo del embudo como resultado de la digestión y se recuperaron en tubos cónicos, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS pH 7.3, finalmente se determinó la carga parasitaria observando 1 L de la muestra al microscopio óptico con el objetivo de 4x (de la Rosa *et al.*, 2011).

Viabilidad de azul tripano

Para determinar la viabilidad de las células nodrizas se colocaron muestras de tejido y se tiñeron con una solución de azul tripano al 0.04% durante 15 minutos, posteriormente se

colocó el tejido teñido entre dos laminillas y se observó al microscopio con objetivos de 4x, 10x y 40x.

Técnica Histológica: Hematoxilina-Eosina (H/E)

El tejido se conservó en formol al 10% para cortes histológicos, con el fin de determinar las características por una tinción de Hematoxilina-Eosina (HE). Los tejidos se deshidrataron para procesarlos en parafina, esto es mediante un procesador de tejidos (Lipshaw Automatic Tissue Processor) de la siguiente manera:

El tejido permanece en formol al 10 % por 12 horas y en alcohol etílico al 80% por 1 hora, luego alcohol etílico del 96%, realizando 3 cambios de 30 min. y alcohol etílico absoluto, 3 cambios cada hora y media, luego Xileno, 2 cambios cada 1.5 horas y finalmente, parafina a 60 °C, en 2 cambios cada hora y media y al final se colocan los tejidos en moldes cúbicos hasta enfriar.

Después de 24 horas, se colocan en cama de hielo para efectuar los cortes, con un espesor de 4 μ m, posteriormente se colocan en un portaobjetos, cubriéndolos con un gel a base de clara de huevo y glicerol en dilución 1:1, más unos granos de Timol como conservador, los cortes se colocan en placa caliente para fundir la parafina y continuar con la tinción con H/E.

El proceso de tinción se lleva a cabo en un tren de tinción: los portaobjetos se colocan en una canastilla que se introduce en las siguientes soluciones: Xileno, 5 min; alcohol etílico absoluto, 3 min.; alcohol etílico al 96%, 3 min.; alcohol etílico del 96% 3 min.; agua destilada; Hematoxilina de Harris, agua potable, alcohol ácido al 1 %, agua potable; solución saturada de carbonato de litio, 2 min; agua potable-Eosina, agua potable, dos cambios en alcohol etílico al 96 %; 3 cambios en alcohol etílico absoluto, Xileno y son montados con resina sintética Sigma y se cubren con un portaobjetos quedando listas para su observación al microscopio óptico a 40x y 100x (Armed Forces, 1957; Chávez *et al.*, 2011).

Obtención del antígeno soluble total de *T. spiralis* (AST)

El AST de *T. spiralis* se obtuvo del paquete larvario de LI de la digestión artificial de un animal de conserva infectado con *T. spiralis*. Con la obtención de las LI de *T. spiralis* se someten a varios lavados con solución básica de fosfatos (PBS), se desengrasa con acetona absoluta a evaporación y se mantiene en PBS, posteriormente se sometieron a un proceso de lisis mediante el uso de nitrógeno líquido con la finalidad de romper cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI, se centrifugó a 3500 rpm por 1.5 horas y finalmente se separó el sobrenadante del precipitado, el cual contiene el antígeno soluble total (AST) mismo que se utiliza como antígeno para las diferentes pruebas en los sueros problema (Moreno *et al.*, 2008).

Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas del AST de *T. spiralis* mediante el Método de Bradford. Se elaboró una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) como se muestra en la tabla 4 y se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (iMark Microplate Reader BIO-RAD, modelo 10465) (Bradford y Lancetti, 1976).

Tabla 4

Curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB).

Curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB).					
Estándar [ASB µg/µL]	Volumen µL ASB	Volumen µL H ₂ O	Volumen Total	Volumen µL Solución estándar	Colorante Bradford µL
0.05	5	95	100	10	200
0.1	10	90	100	10	200
0.2	20	80	100	10	200
0.3	30	70	100	10	200
0.4	40	60	100	10	200
0.5	50	50	100	10	200
0.6	60	40	100	10	200
Blanco	0	100	100	10	200

Microinmunodifusión doble (MIDD)

Para la microinmunodifusión se elabora un gel de agar al 1 % en agua destilada con azida de sodio, para evitar contaminación; se coloca una cantidad de 4.5 ml a 55°C sobre una laminilla de vidrio, una vez en forma sólida, se procede a formar la roseta con un horador, procurando una equidistancia de 0.5 cm entre pozo y pozo; la confrontación se realiza colocando siempre el antígeno soluble total de *T. spiralis* en una cantidad de 10 L en el centro y, en torno a éste, un suero de reactividad conocida, (en la misma proporción en volumen sin diluir), se deja a temperatura ambiente en cámara húmeda de 24 a 48 horas, hasta observar líneas de precipitación entre el suero positivo y el antígeno; luego se procede a teñir el gel con azul brillante de Coomassie G 250, en un 25 % en volumen (Ouchterlony, 1958).

Técnica de Dot – ELISA

El papel de nitrocelulosa se cuadricula de 1 cm² ocupando un total de 10 cm² para cada prueba con el fin de que fueran analizados cada vez 100 sueros. Se pega el antígeno al papel colocando 1 L en cada cuadro lo que equivale a 0.9 mg de AST de *T. spiralis*, se deja toda la noche a temperatura ambiente bloqueando con leche libre de grasa al 3% al día siguiente por 1 hora se lava por una ocasión con PBS–Tween 20 al 0.5 % con agitación por 10 minutos, se colocan los sueros problema totales en una cantidad de 1 L por cuadro, dejándolo incubar por 1 hora, lavando nuevamente con PBS–Tween 20 al 0.5 % por 10 minutos y posteriormente se coloca el segundo anticuerpo Anti-IgG de rata conjugado a peroxidasa en dilución 1:500 en PBS incubando por 1 hora, lavando con PBS–Tween 20 al 0.5 % 2 ocasiones por 10 minutos, se enjuaga con PBS por 10 minutos y se revela con 3-3'-di-amino Benzydina usando peróxido de hidrógeno al 37 % como sustrato (Aguilar *et al.*, 2000).

Inmunofluorescencia

En un tubo eppendorf se ponen 15 L de LI que estén viables, se le agrega 1000 L de PBS y se hacen tres lavados por 5 minutos cada uno, en cada lavado se quitan 900 L y se vuelven a poner 900 L de PBS para el siguiente lavado.

Después de los tres lavados se vuelven a sacar 900 L y se agregan 20 L del primer anticuerpo y se incuban por 45 minutos, posteriormente se hacen tres lavados por 5 minutos cada uno, en cada lavado se quitan 900 L y se vuelven a agregar 900 L de PBS para el siguiente lavado. Al terminar los lavados se agrega el segundo anticuerpo marcado, en cada tubo se ponen 200 L del anticuerpo preparado a una dilución 1:500, los tubos se tapan con papel aluminio y se incuban 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación con el anticuerpo marcado se hacen otros tres lavados y los tubos se vuelven a tapar con aluminio para ser llevados a tomar las fotos en el microscopio, en cada laminilla se ponen 10 L de la muestra para ser observada al microscopio confocal.

Procesamiento de datos

El modelo estadístico que avala el trabajo fue realizado por el software Graphpad PRISM versión 6 empleando la tabla ANOVA para demostrar los niveles de confianza y el grado de error de los resultados, tomando en cuenta los grupos: anticuerpos, la carga parasitaria, efecto de protección.

Variables independientes: Madre, producto, dosis de LI, meses de presencia de anticuerpos.

Variables dependientes: Detección del tipo de anticuerpos, eosinofilia, carga parasitaria, técnicas histológicas.

RESULTADOS

Órganos reproductores de la hembra y el macho en rata y ratón

El aparato reproductor del macho y de la hembra se encontraron situados en la parte posterior del abdomen, en ambos sexos la parte esencial son las glándulas reproductivas, en el macho son los testículos y en la hembra los ovarios, como se observa en la figura 9, las imágenes a y b son órganos del grupo control sano, en las imágenes c y e se observa el aparato reproductor de la hembra, donde se muestran los ovarios, las trompas uterinas, el útero y la vagina, el aparato reproductor del macho que se observa en las imágenes d y f muestran el escroto, el par de testículos y el pene sin alteración alguna debido a que son órganos de animales infectados con *T. spiralis*.

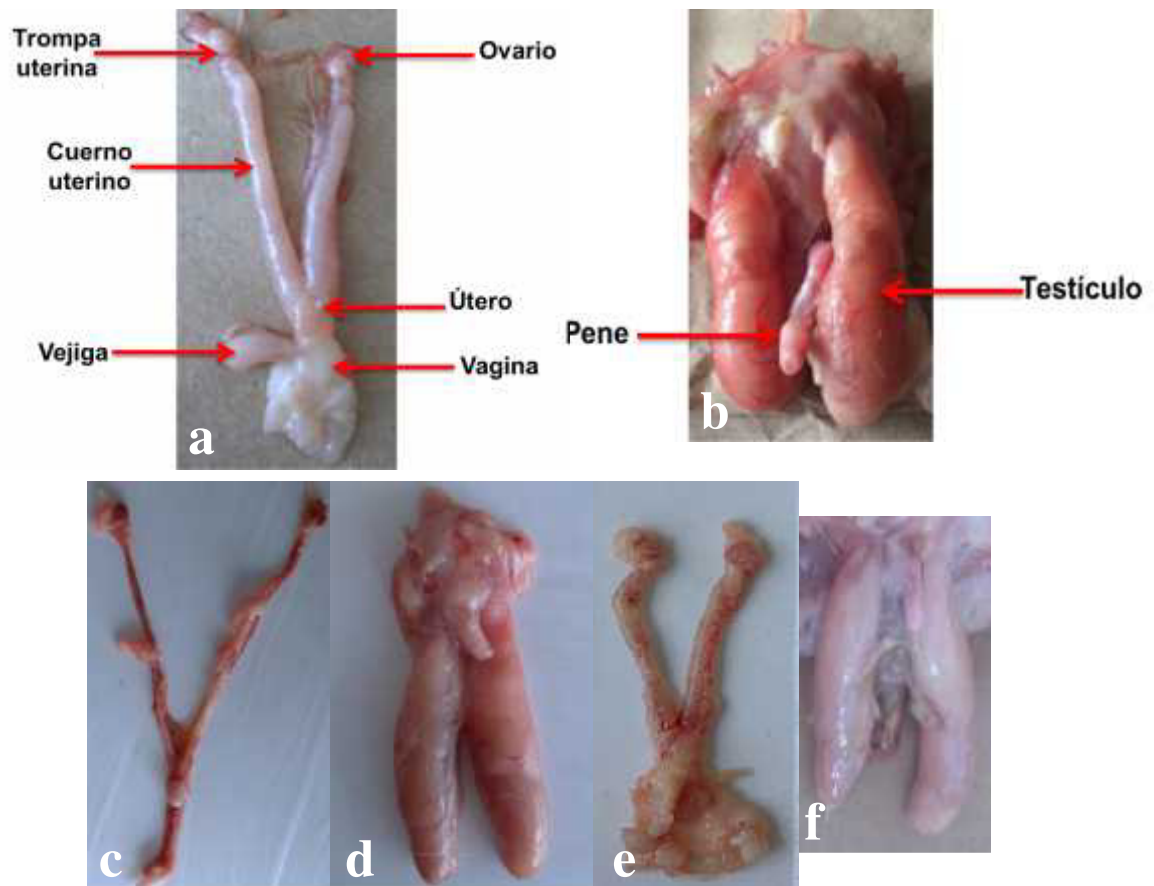


Figura 9. Órganos reproductores de ratas y ratones. Se observan órganos sexuales de un animal sano (a y b), órganos de ratas Long Evans infectadas con 750 LI de *T. spiralis* (c y d) y órganos de ratones Balb/c (e y f) infectados con 250 LI de *T. spiralis*, los cuales no tienen alteraciones.

Los cuernos uterinos en la figura 10 muestran el proceso de gestación donde se observa que estos mamíferos son animales multíparas y se encuentran irrigados los productos y la gran cantidad de éstos por cada cuerno uterino.

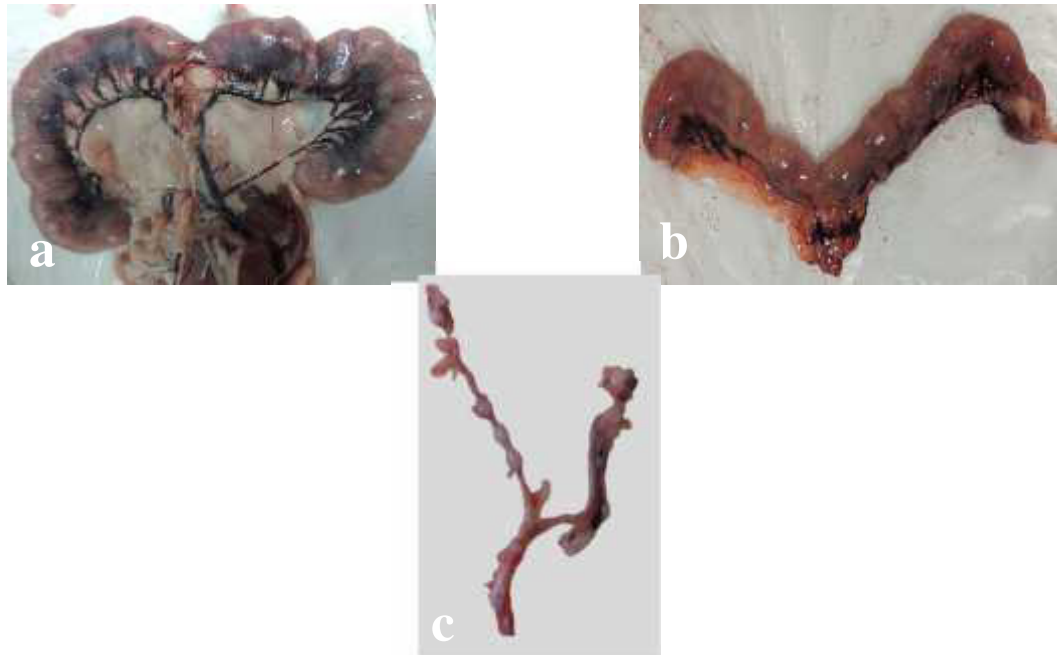


Figura 10. Cuernos uterinos de ratas y ratones. Se observan los cuernos uterinos en proceso de gestación, en la imagen a, se muestran cuernos uterinos de ratas Long Evans control sano, b muestra cuernos uterinos de ratas Long Evans infectadas con 500 LI de *T. spiralis* y la imagen c cuernos uterinos de ratones Balb/c infectados con 125 LI de *T. spiralis*.

El número de productos que tuvo cada rata y ratón fue variable, las ratas sin infección tuvieron de 12 a 14 productos por cada rata adulta, las ratas infectadas con 500 LI de *T. spiralis* tuvieron de 9 a 11 productos por cada rata adulta, las ratas infectadas con 750 LI de *T. spiralis* tuvieron 11 productos por cada rata adulta y las ratas infectadas con 1000 LI de *T. spiralis* tuvieron de 8 a 12 productos por cada rata adulta.

Los ratones también fueron infectados con diferentes cargas parasitarias y se observó que en el caso de los ratones sin infección se tuvo desde 9 hasta 15 productos por ratón adulto, los ratones infectados con 125 LI de *T. spiralis* tuvieron desde 5 hasta 12 productos por ratón adulto, los ratones infectados con 250 LI de *T. spiralis* tuvieron desde 2 hasta 4 productos por ratón y los ratones infectados con 500 LI de *T. spiralis*

tuvieron desde 1 hasta 3 productos por ratón, los cuales después de unas horas de nacidos murieron.

En la figura 11 se tienen productos de ratas adultas que fueron infectadas con 500 LI (a), 750 LI (b) y 1000 LI (c) de *T. spiralis*, además de productos de ratones adultos que fueron infectados con 125 LI (d), 250 LI (e) y 500 LI (f) de *T. spiralis* los cuales no presentan malformaciones físicas.



Figura 11. Productos de ratas y ratones adultos. Las imágenes a, b y c son productos de ratas Long Evans (a) 15 días de gestación de padres infectados con 500 LI, (b) 1 día de nacido de padres infectados con 750 LI y (c) una semana de nacido de padres infectados con 1000 LI de *T. spiralis*, d, e y f son productos de ratones Balb/c (d) 1 día de nacidos de padres infectados con 125 LI, (e) 1 día de nacido de padres infectados con 250 LI y (f) 1 semana de nacido de padres infectados con 500 LI de *T. spiralis*, en el que se observa que el producto de ratones infectados con 500 LI está muerto, no obstante ninguno presenta malformaciones.

Histología de animales adultos

La técnica de tinción de Hematoxina-Eosina (H-E) muestra los cambios en la morfología del parásito implantado en tejido de murinos, del grupo control sano como los grupos infectados con las diferentes cargas parasitarias.

A. Ratas adultas

La figura 12, muestra cortes histológicos de las trompas uterinas del grupo control sano y de ratas adultas, en la imagen (a) se observa la trompa uterina con su músculo liso y estroma normal sin problema de ratas Long Evans control sano, (b) muestra el tejido normal de las trompas uterinas de ratas Long Evans infectadas con 500 LI de *T. spiralis*, en (c) se tiene el tejido normal de las trompas uterinas sin alteraciones de ratas Long Evans infectadas con 750 LI de *T. spiralis*, (d) muestra el tejido normal de las trompas uterinas de ratas Long Evans infectadas con 1000 LI de *T. spiralis*, todos los tejidos se observaron en condiciones normales sin presencia de LI de *T. spiralis*.

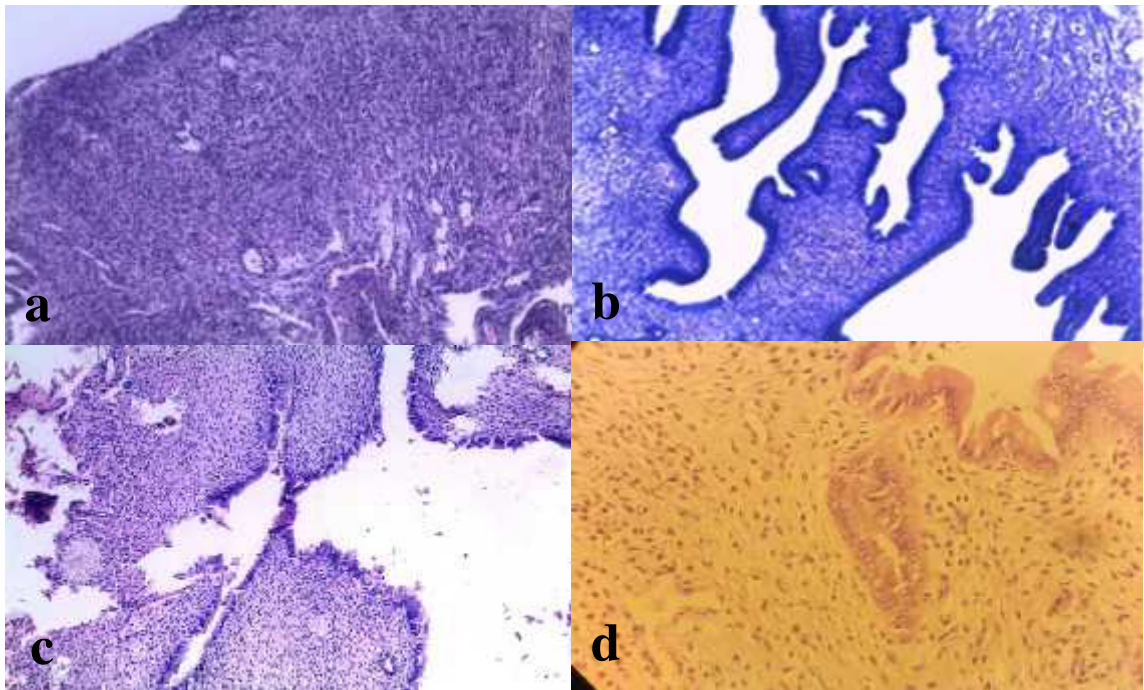


Figura 12. Tejidos de las trompas uterinas del grupo control sano y de las ratas adultas infectadas. Se muestran tejidos del grupo control sano y de las ratas adultas infectadas con las diferentes cargas parasitarias por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde (a) Trompa uterina 4x de ratas control sano, (b) Trompa uterina 4x de ratas Long Evans infectadas con 500 LI de *T. spiralis*, (c) Trompa uterina 4x de ratas Long Evans infectadas con 750 LI de *T. spiralis* y (d) Trompa uterina 4x de ratas Long Evans infectadas con 1000 LI de *T. spiralis*.

La figura 13 muestra cortes histológicos del grupo control sano y de las ratas adultas infectadas con las diferentes cargas parasitarias de los principales tejidos donde se enquistan LI de *T. spiralis* en animales infectados, en la imagen (a) muestra el diafragma que es un músculo estriado, el cual no muestra alteración alguna de ratas Long Evans control sano, (b) es el diafragma de ratas Long Evans infectadas con 500 LI de *T. spiralis* con poca reacción inflamatoria, (c) diafragma de ratas Long Evans infectadas con 750 LI de *T. spiralis* con presencia de reacción inflamatoria alrededor de los quistes de *T. spiralis*, (d) diafragma de ratas Long Evans infectadas con 1000 LI de *T. spiralis* con reacción inflamatoria leve alrededor de los quistes.

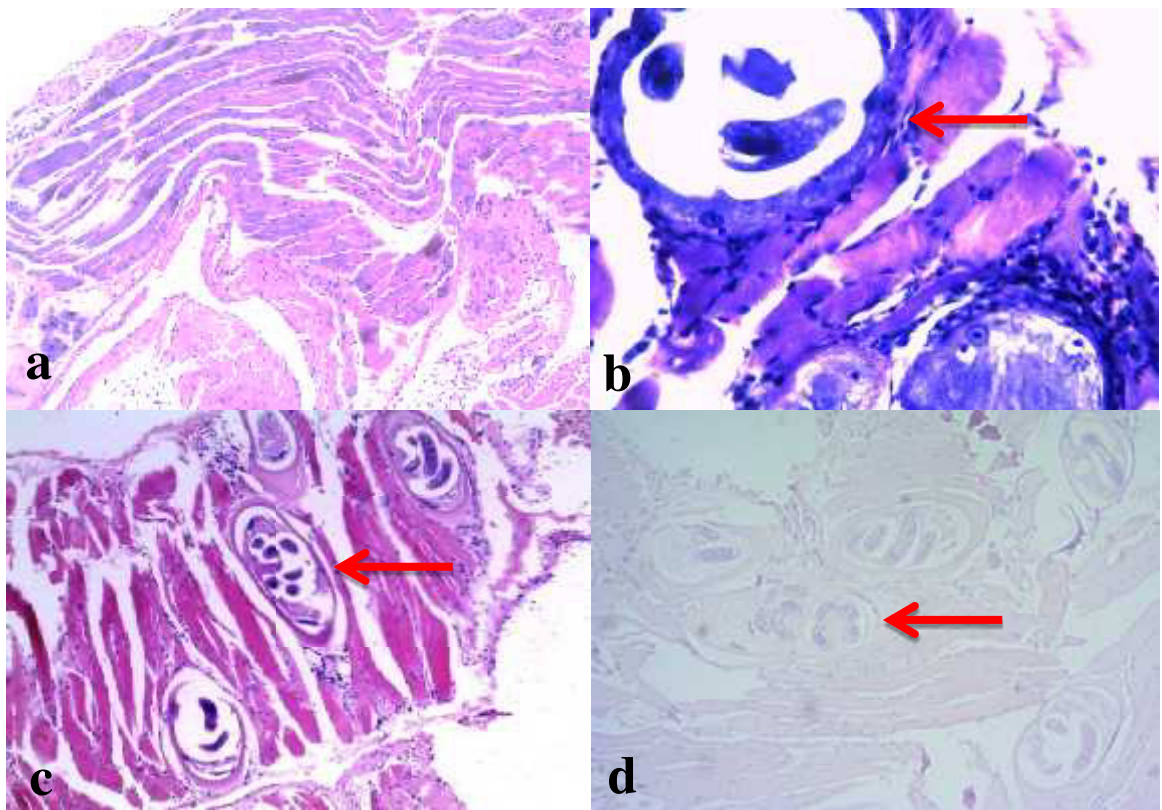


Figura 13. Tejidos del grupo control sano y de las ratas adultas infectadas. Se muestran tejidos del grupo control sano y de las ratas adultas infectadas con las diferentes cargas parasitarias por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde (a) Diafragma 10x de ratas Long Evans control sano, (b) Diafragma 40x de ratas Long Evans infectadas con 500 LI de *T. spiralis*, (c) Diafragma 10x de ratas Long Evans infectadas con 750 LI de *T. spiralis* y (d) Diafragma 10x de ratas Long Evans infectadas con 1000 LI de *T. spiralis*.

B. Grupos en proceso de gestación

La figura 14 muestra cortes histológicos de ratas Long Evans con cargas parasitarias de 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis*, son cortes de placenta y de productos.

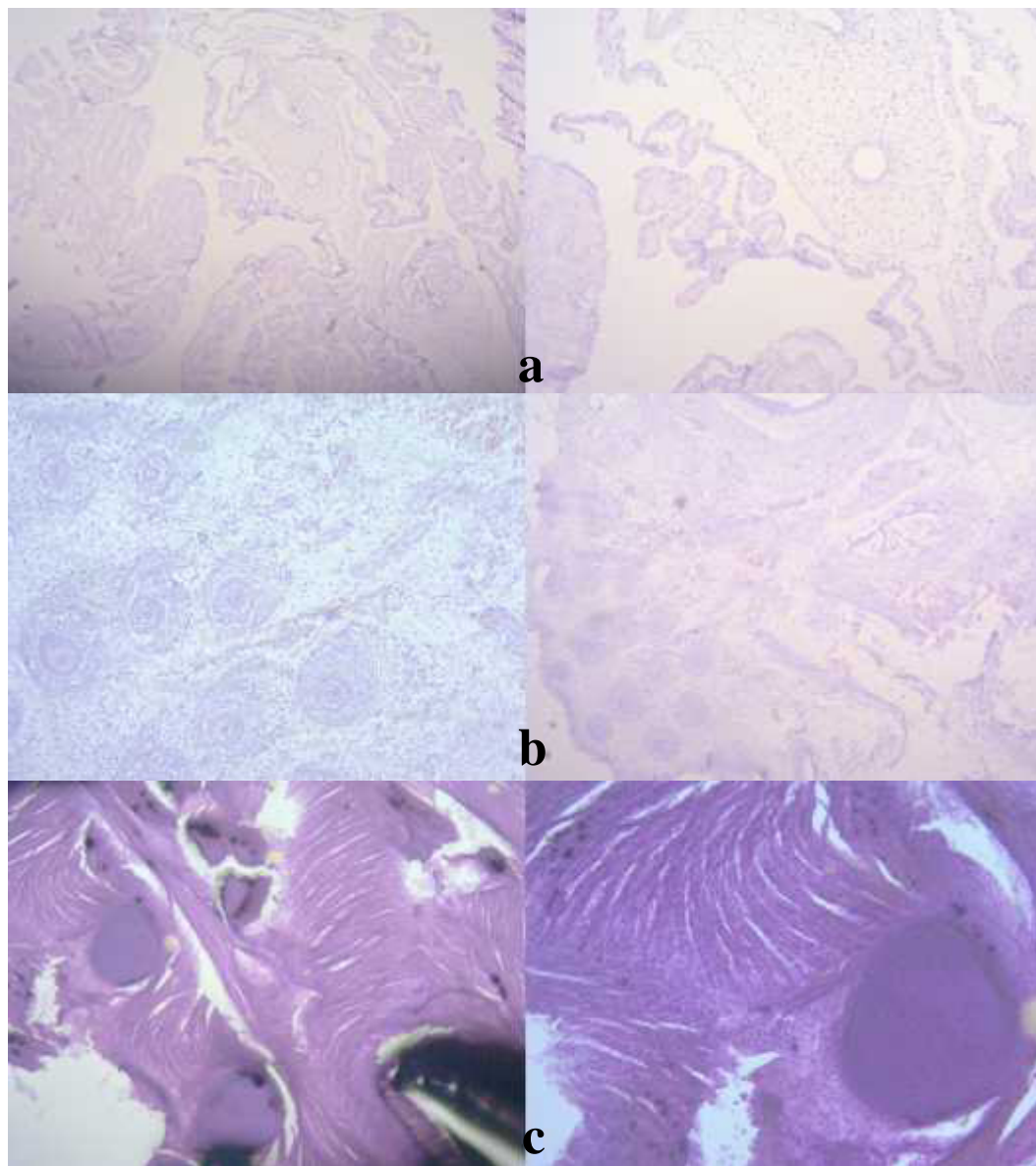


Figura 14. Tejidos del grupo en proceso de gestación. Se muestran tejidos del grupo que estaba en proceso de gestación por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde en la imagen (a) vemos la placenta normal de una rata infectada con 500 LI de *T. spiralis*, (b) es el producto y la placenta de una rata infectada con 1000 LI de *T. spiralis* que se observan normales y en (c) observamos el producto y la placenta de una rata infectada con 750 LI de *T. spiralis*, donde se muestran células trofoblásticas y tejido placentario sin alteración.

C. Ratones adultos

La figura 15 muestra cortes histológicos de las trompas uterinas del grupo control sano y de ratones adultos, en la imagen (a) se observa la trompa uterina con su músculo liso, estroma normal sin problema de ratones Balb/c control sano, (b) muestra el tejido normal de las trompas uterinas de ratones Balb/c infectados con 125 LI de *T. spiralis*, (c) tiene el músculo liso, estroma normal sin problema de ratones Balb/c infectados con 250 LI de *T. spiralis*, (d) muestra el tejido normal de las trompas uterinas de ratones Balb/c infectados con 500 LI, todos los tejidos se observaron en condiciones normales sin presencia de LI de *T. spiralis*.

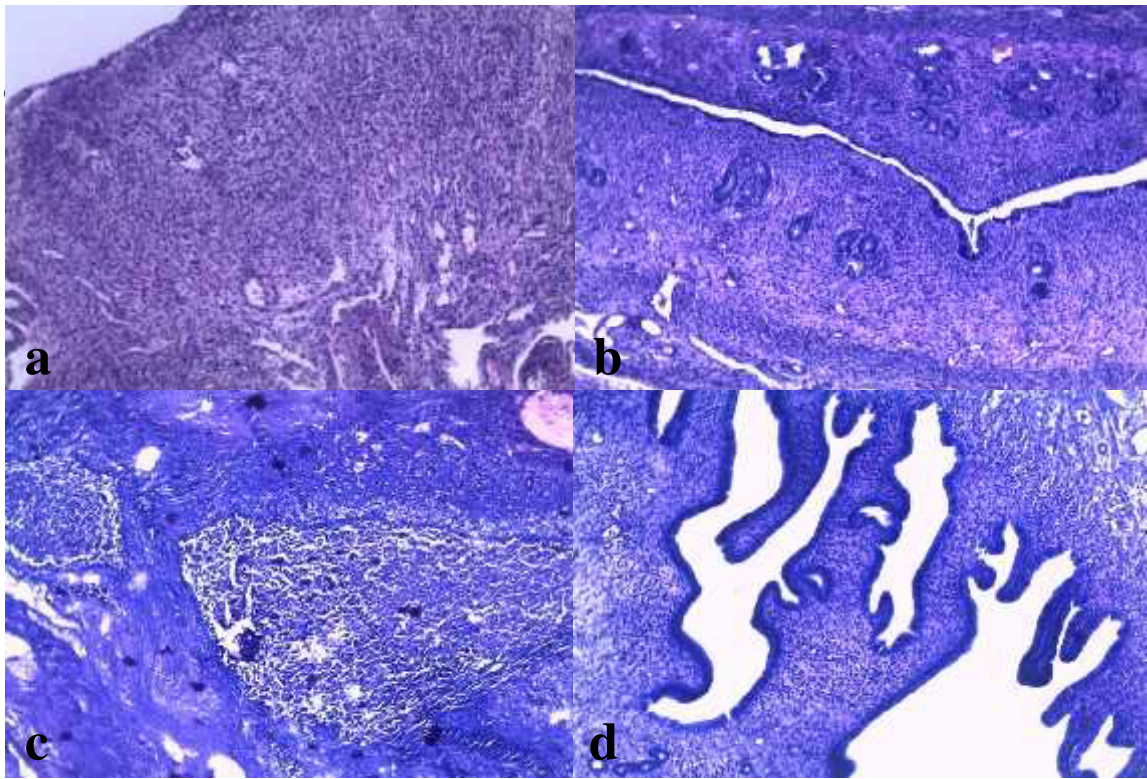


Figura 15. Tejidos de las trompas uterinas del grupo control sano y de los ratones adultos infectados. Se muestran tejidos del grupo control sano y de los ratones adultos infectados con las diferentes cargas parasitarias por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde (a) Trompa uterina 4x de ratones Balb/c control sano, (b) Trompa uterina 4x de ratones Balb/c infectados con 125 LI de *T. spiralis*, (c) Trompa uterina 4x de ratones Balb/c infectados con 250 LI de *T. spiralis* y (d) Trompa uterina 4x de ratones Balb/c infectados con 500 LI de *T. spiralis*.

La figura 16 muestra cortes histológicos del grupo control sano y de los ratones adultos infectados con las diferentes cargas parasitarias de los principales tejidos donde se enquistan LI de *T. spiralis* en animales infectados, en la imagen (a) vemos el diafragma que es un músculo estriado, el cual no muestra alteración alguna de ratones Balb/c control sano, (b) es el diafragma de ratones Balb/c infectados con 125 LI de *T. spiralis* con poca reacción inflamatoria, (c) diafragma de ratones Balb/c infectados con 250 LI de *T. spiralis* con presencia de reacción inflamatoria aguda alrededor de los quistes de *T. spiralis*, (d) diafragma de ratones Balb/c infectados con 500 LI de *T. spiralis* con reacción inflamatoria leve alrededor de los quistes.

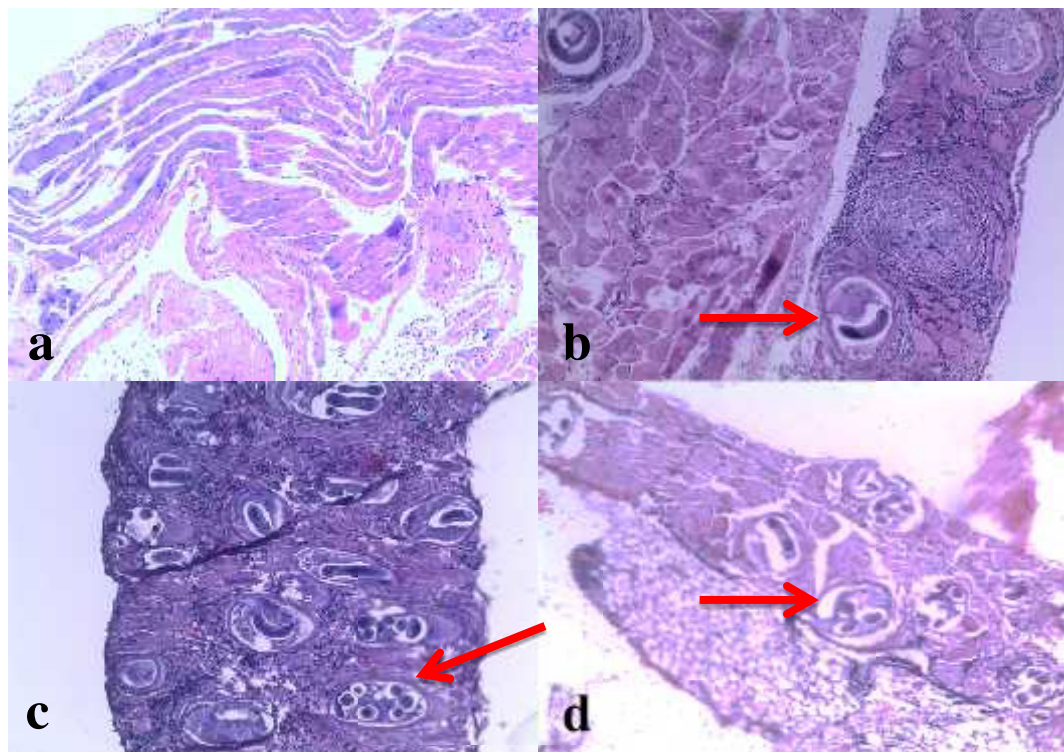


Figura 16. Tejidos del grupo control sano y de los ratones adultos infectados. Se muestran tejidos del grupo control sano y de los ratones adultos infectados con las diferentes cargas parasitarias por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde (a) Diafragma 10x de ratones Balb/c control sano, (b) Diafragma 10x de ratones Balb/c infectados con 125 LI de *T. spiralis*, (c) Diafragma 10x de ratones Balb/c infectados con 250 LI de *T. spiralis* y (d) Diafragma 10x de ratones Balb/c infectados con 500 LI de *T. spiralis*.

Eosinofilia de animales adultos

La eosinofilia es una respuesta que se da durante el proceso de infección por *T. spiralis*, mecanismo que daña a los parásitos mediante la producción de sustancias vaso activas.

La eosinofilia periférica que se ve en la figura 17, fue evaluada después de 1 mes de la infección por *T. spiralis* en ratas adultas infectadas con 500, 750 y 1000 LI (Gráfica 1) y en ratones adultos infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis* (Gráfica 2).

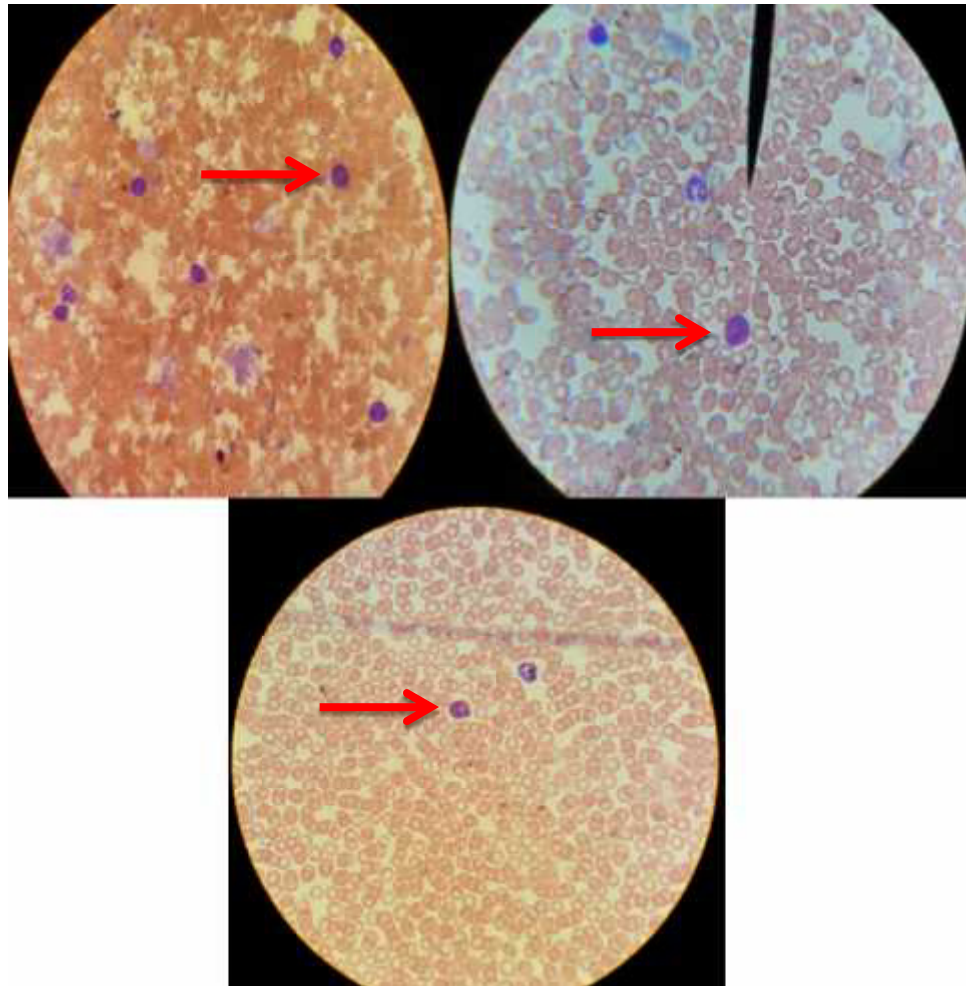
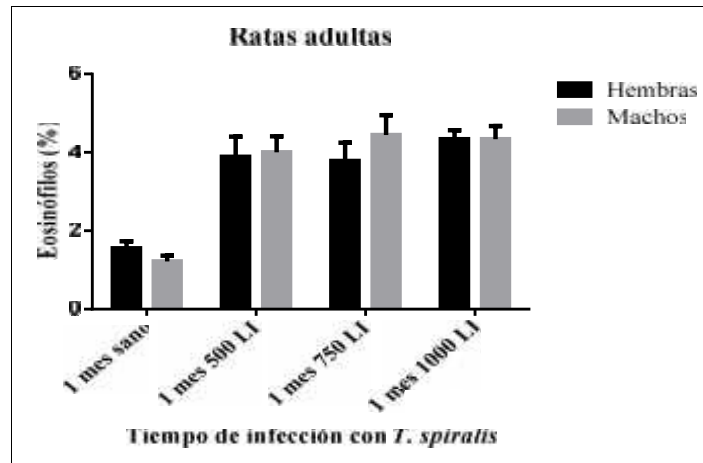


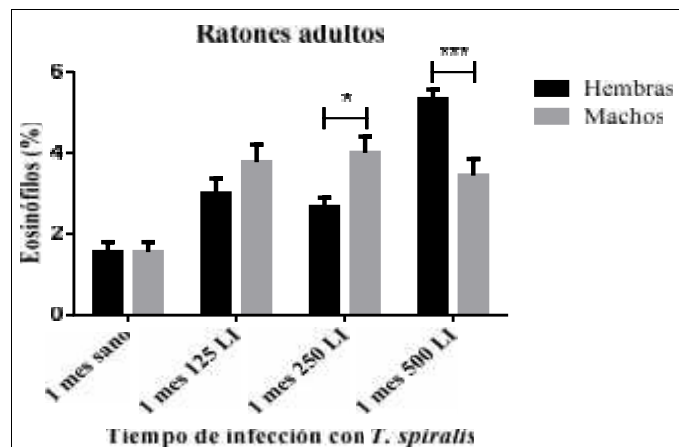
Figura 17. Eosinófilos presentes en sangre periférica. Se muestran frotis sanguíneos de ratas Long Evans (a y b) infectadas con 500 y 1000 LI de *T. spiralis* y ratones Balb/c (c) infectados con 125 LI de *T. spiralis*, teñidos con colorante Wrigth, donde se muestran las diferentes células sanguíneas, entre ellas los eosinófilos, laminillas observadas al microscopio óptico de luz a 100x.

La gráfica 1 muestra el análisis del porcentaje de eosinófilos presentes en los diferentes grupos de ratas Long Evans hembras y machos adultos con diferentes cargas parasitarias donde se observa que no hay diferencia significativa entre hembra y macho con la misma infección después del mes de infección.



Gráfica 1. Eosinofilia periférica en ratas Long Evans adultas infectadas con *T. spiralis*. Se observa el porcentaje de eosinófilos en los diferentes grupos de ratas adultas, donde se tiene el grupo sano y las infectadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* después del mes de infección.

La gráfica 2 muestra las diferencias entre los grupos de ratones Balb/c hembras y machos adultos con las diferentes cargas parasitarias donde se observa que hay diferencia significativa entre hembra y macho infectados con 250 LI de *T. spiralis* con 1 mes de infección y también en el grupo de ratones infectados con 500 LI de *T. spiralis*.



Gráfica 2. Eosinofilia periférica en ratones Balb/c adultos infectados con *T. spiralis*. Se observa el porcentaje de eosinófilos en los diferentes grupos de ratones adultos, donde se tiene el grupo sano y los infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con *($P < 0.05$) y ***($P < 0.001$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

Determinación de implantación en hembras y machos

La técnica de compresión en placa nos permite observar la presencia de *T. spiralis* en los diferentes tejidos como diafragma, lengua, pierna y masetero, además de poder determinar las características de la implantación en tejido, en la figura 18 se observa la implantación del parásito de *T. spiralis* en tejidos de ratas Long Evans adultas y en la figura 19 la implantación del parásito de *T. spiralis* en ratones Balb/c adultos y en las gráficas 3 y 4 se ve de manera cuantitativa la implantación de *T. spiralis* en los animales adultos ratas y ratones infectadas con 500, 750 y 1000 LI y ratones infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis*.

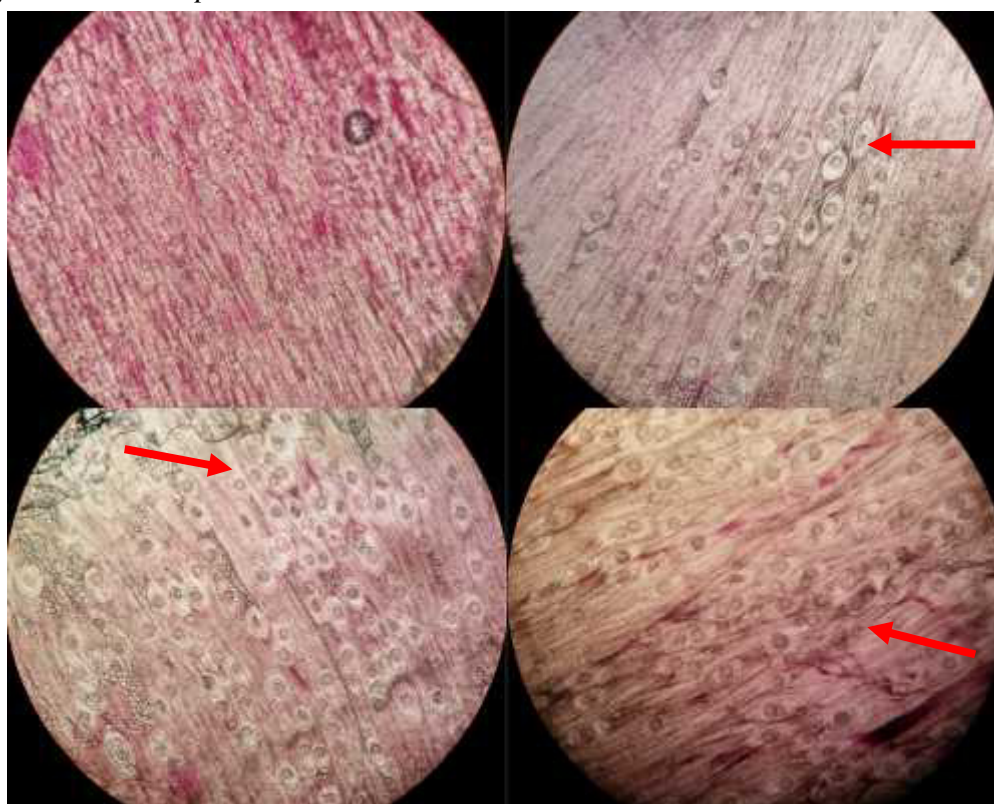
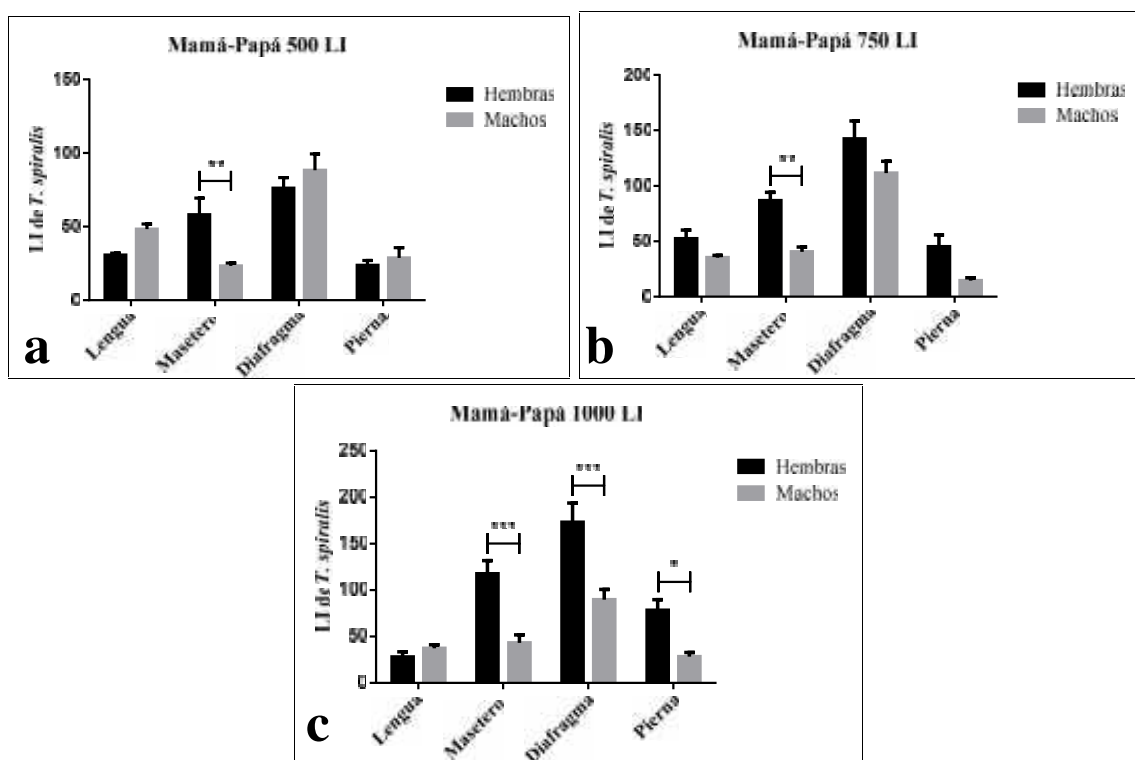


Figura 18. Tejidos musculares de ratas adultas con la presencia de LI de *T. spiralis*. Se muestra la técnica de compresión en placa de tejidos musculares de ratas Long Evans adultas con la presencia de LI de *T. spiralis*, observando diafragma de rata control sano (a), diafragma de rata infectada con 500 LI de *T. spiralis* (b), diafragma de rata infectada con 750 LI de *T. spiralis* (c) y diafragma de rata infectada con 1000 LI de *T. spiralis* (d) al microscopio óptico de luz a 4x.

La gráfica 3 muestra el número de LI de *T. spiralis* implantadas en ratas hembras y machos adultos en los principales tejidos donde se aloja el parásito como es lengua, masetero, diafragma y pierna, donde se observa que las ratas infectadas con 500 LI de *T. spiralis* (a) presentan diferencia significativa en la implantación en masetero de hembra y macho, las ratas adultas con infección de 750 LI de *T. spiralis* (b) también presentan diferencia significativa en masetero entre hembras y machos, y las ratas adultas infectadas con 1000 LI de *T. spiralis* (c) presentan diferencia significativa en masetero, diafragma y pierna.



Gráfica 3. Implantación de *T. spiralis* en tejido muscular de ratas Long Evans adultas. Se observa el número de LI implantadas en los diferentes grupos de ratas hembras y machos adultos infectados con 500 (a), 750 (b) y 1000 (c) LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con *($P < 0.05$), **($P < 0.01$) y ***($P < 0.001$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

La figura 19 muestra la implantación del parásito de *T. spiralis* en el diafragma de ratones Balb/c adultos sanos, infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis*.

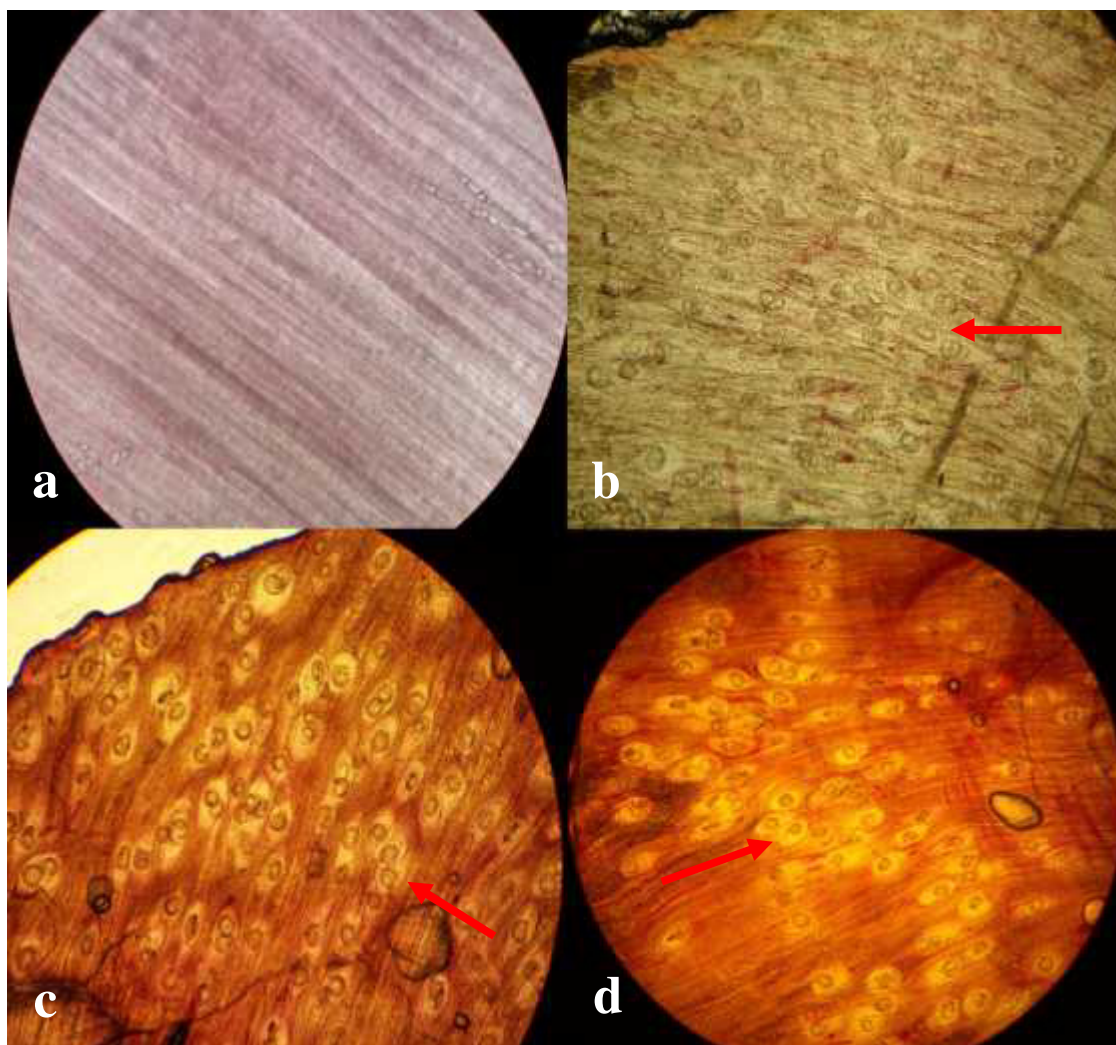
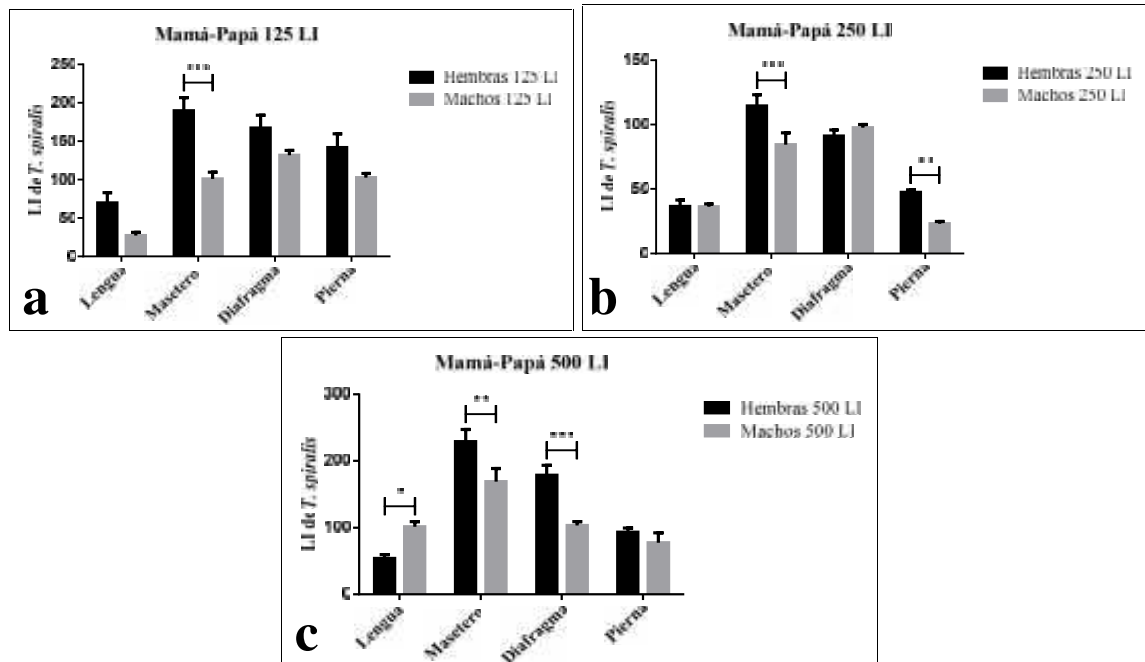


Figura 19. Tejidos musculares de ratones adultos con la presencia de LI de *T. spiralis*. Se muestra la técnica de compresión en placa de tejidos musculares de ratones Balb/c adultos con la presencia de LI de *T. spiralis*, observando diafragma de ratón control sano (a), diafragma de ratón infectado con 125 LI de *T. spiralis* (b), diafragma de ratón infectado con 250 LI de *T. spiralis* (c) y diafragma de ratón infectado con 500 LI de *T. spiralis* (d) al microscopio óptico de luz a 4x.

La gráfica 4 muestra el número de LI de *T. spiralis* implantadas en ratones hembras y machos adultos en los principales tejidos donde se aloja el parásito de *T. spiralis* como es lengua, masetero, diafragma y pierna, donde se observa que los ratones infectados con 125 LI de *T. spiralis* (a) presentan diferencia significativa en la implantación en masetero de hembra y macho, los ratones adultos con infección de 250 LI de *T. spiralis* (b) presentan diferencia significativa en masetero y pierna entre hembras y machos, y los

ratones adultos infectados con 500 LI de *T. spiralis* (c) presentan diferencia significativa en lengua, masetero y diafragma.



Gráfica 4. Implantación de *T. spiralis* en tejido muscular de ratones Balb/c adultos. Se observa el número de larvas implantadas en los diferentes grupos de ratones hembras y machos adultos infectados con 125 (a), 250 (b) y 500 (c) LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

Cuantificación de carga parasitaria en hembras y machos

La digestión artificial nos permite la obtención de LI con el objetivo de observar la forma como se muestra en la figura 20 y así mismo obtener la carga parasitaria (gráfica 5 y 6) con la que fueron infectados los animales adultos.

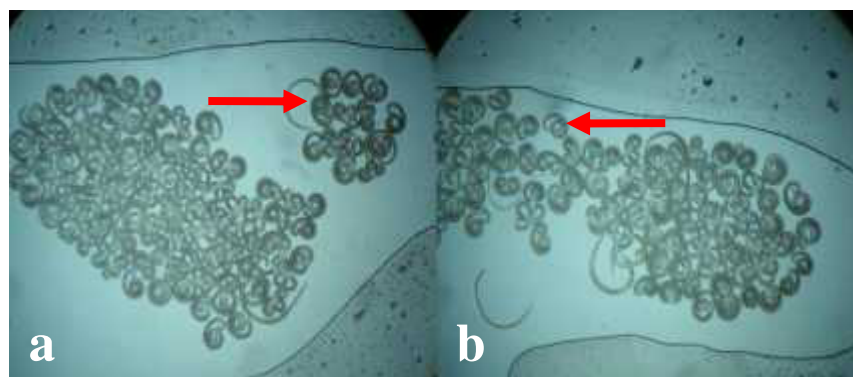
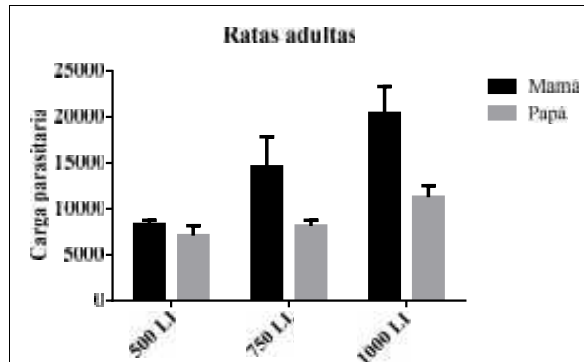


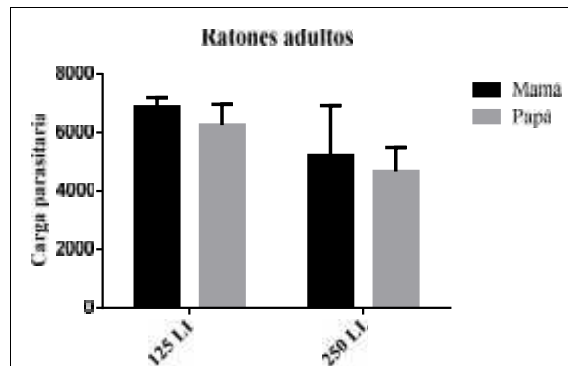
Figura 20. LI obtenidas por medio de la digestión artificial. Se observan en un microscopio óptico de luz a 4x, las LI que fueron obtenidas de la digestión artificial de ratas Long Evans adultas (a), ratones Balb/c adultos (b), donde se ve la estructura bien definida y su forma característica de espiral de *T. spiralis*.

La gráfica 5 muestra la carga parasitaria entre ratas Long Evans hembras y machos adultos infectadas con las diferentes cargas de 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis*, donde se observa que no hay diferencia significativa entre hembras y machos adultos con la misma infección.



Gráfica 5. Carga parasitaria de ratas adultas Long Evans. En la gráfica se observa la carga parasitaria entre hembras y machos adultos con las diferentes cargas parasitarias de *T. spiralis*.

La gráfica 6 muestra la carga parasitaria entre ratones Balb/c hembras y machos adultos infectados con las diferentes infecciones de 125 y 250 LI de *T. spiralis*, donde se ve que no hay diferencia significativa entre hembras y machos adultos con la misma infección.



Gráfica 6. Carga parasitaria de ratones adultos Balb/c. En la gráfica se observa la carga parasitaria entre hembras y machos adultos con las diferentes cargas parasitarias de *T. spiralis*.

Viabilidad

La tinción con azul tripano muestra la viabilidad de las células nodrizas de *T. spiralis*. La figura 21 muestra tejidos de los animales adultos ratas y ratones, así como LI obtenidas por medio de la digestión artificial, imágenes que muestran que la célula nodriza y las LI son viables ya que no existe penetración del colorante sobre la LI.

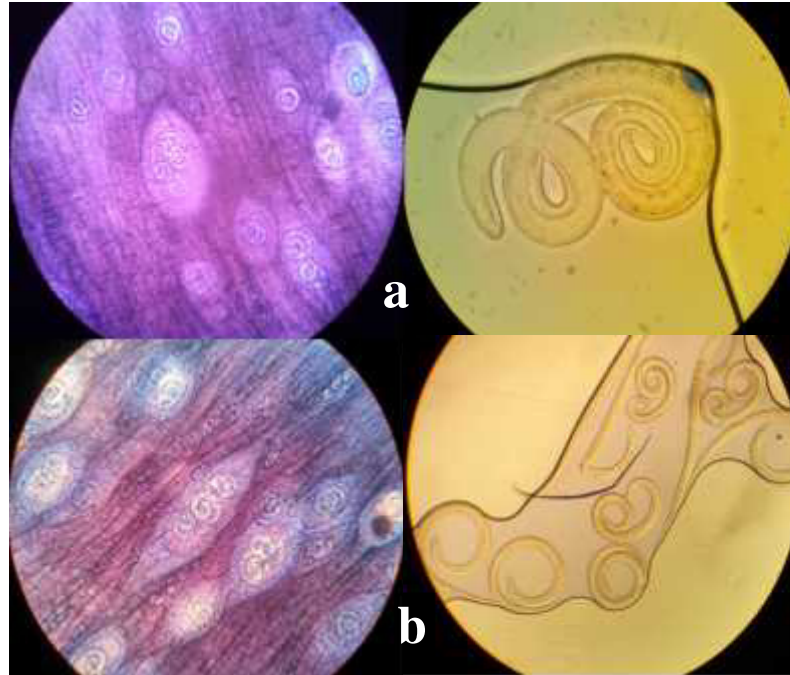
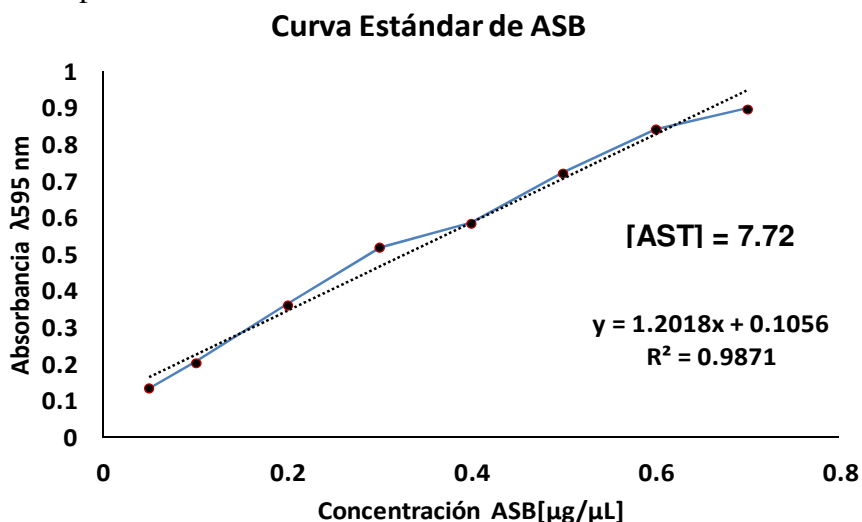


Figura 21. Tejido muscular y LI de animales adultos teñidos con azul tripano. Se muestra tejido muscular y LI obtenidas de la digestión artificial de ratas Long Evans y ratones Balb/c adultos tratados mediante la técnica de viabilidad con azul tripano, (a) diafragma 10x y LI de *T. spiralis* 40x de ratas Long Evans adultas y (b) diafragma 10x y LI de *T. spiralis* 40x de ratones Balb/c adultos, vistos al microscopio óptico de luz.

Obtención de AST y Determinación del Patrón Antigénico del AST de *T. spiralis*

La obtención del AST se realizó mediante el paquete de LI de *T. spiralis* obtenido de la técnica de digestión artificial, ya obteniendo el AST mediante el uso de nitrógeno líquido se hizo la determinación de la concentración de proteínas del AST de *T. spiralis* mediante el Método de Bradford. Se elaboró una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) como se muestra en la gráfica 7 y se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas.



Gráfica 7. Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB).

La figura 22 muestra el peso correspondiente a los antígenos característicos de *T. spiralis* con su triplete característico.

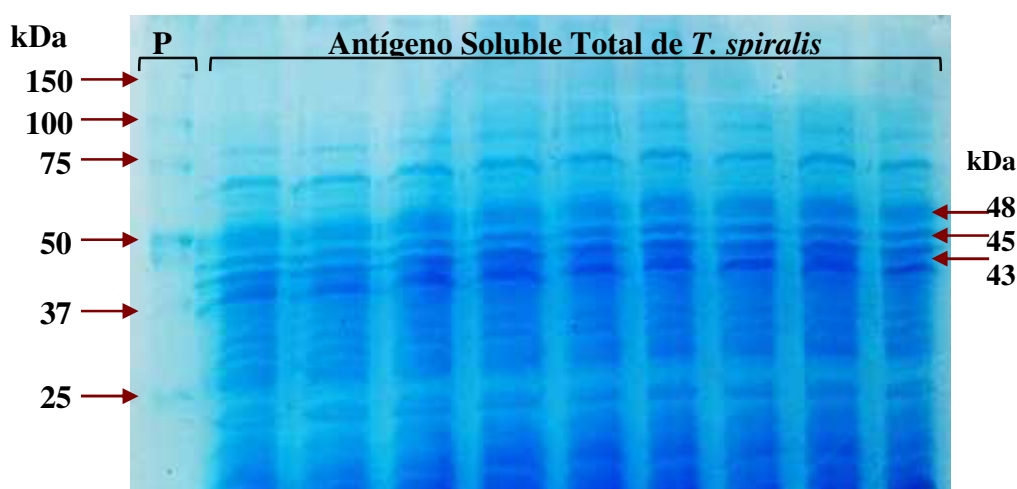


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se muestra corrimiento electroforético en gels de poliacrilamida del AST de *T. spiralis*, en el primer carril tenemos el peso molecular y en los demás carriles está el AST de *T. spiralis* predominando el triplete de 42, 45 y 48 kDa.

Técnica de microinmunodifusión doble (MIDD) en ratas y ratones adultos

La microinmunodifusión doble es una técnica inmunológica con base en la interacción antígeno-anticuerpo la cual arroja resultados positivos en los animales adultos desde el primer mes de infección, en la tabla 5 se ven los resultados al mes y a los 3 meses de infección y en la figura 23 se observa la interacción antígeno-anticuerpo de los sueros de ratas y ratones adultos.

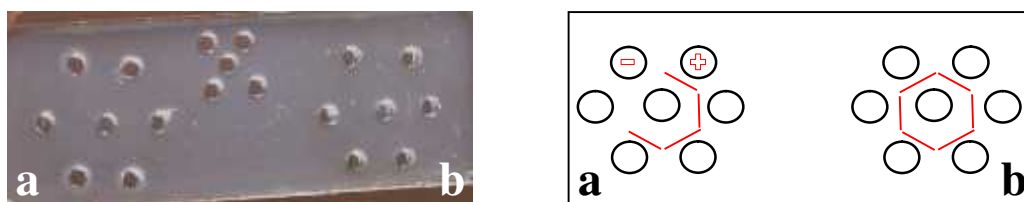


Figura 23. MIDD con sueros de ratones Balb/c y ratas Long Evans adultos infectados con *T. spiralis*. Se muestra la técnica de MIDD con sueros de ratones Balb/c adultos infectados con 125, 250 y 500 LI (a) y ratas Long Evans adultas infectadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* (b).

La tabla 5 muestran los resultados de las lecturas de las laminillas a las 24 y 48 horas para la visualización de la interacción antígeno-anticuerpo, donde se usan sueros de ratas y ratones adultos infectadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* y sueros de ratones adultos infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis*.

Tabla 5

Reacción Ag-Ac por MIDD de sueros de ratas Long Evans y ratones Balb/c adultos

Ratas y ratones adultos			
	Grupo	1 mes de infección	3 meses de infección
Ratas Long Evans	Control -	-	-
	Madres 500 LI	+	+
	Madres 750 LI	+	+
	Madres 1000 LI	+	+
Ratones Balb/c	Control -	-	-
	Madres 125 LI	+	+
	Madres 250 LI	+	+
	Madres 500 LI	+	+

Dot-ELISA de ratas y ratones adultos

La técnica de Dot-ELISA fue usada para detectar presencia de anticuerpos clase IgG, IgM, IgA y policlonal contra antígenos de *T. spiralis* en ratas adultas infectadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* y sueros de ratones Balb/c para detectar anticuerpos contra antígenos de *T. spiralis*, en animales adultos infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis*. La tabla 6 muestra que el primer y el último mes de sangrado de las ratas y ratones adultos nos dan positivo con las diferentes infecciones de *T. spiralis*.

Tabla 6

Dot-ELISA con anticuerpos policlonal (IgG, IgM, IgA), IgG, IgM e IgA con sueros de ratas Long Evans adultas y ratones Balb/c adultos infectados con *T. spiralis* a diferentes tiempos

Ratas y ratones adultos						
			Policlonal	IgG	IgM	IgA
PBS			-	-	-	-
Control -			-	-	-	-
Control +			+	+	+	+
Ratas Long Evans	500 LI	1 mes	+	+	+	+
		3 meses	+	+	+	+
	750 LI	1 mes	+	+	+	+
		3 meses	+	+	+	+
	1000 LI	1 mes	+	+	+	+
		3 meses	+	+	+	+
Ratones Balb/c	125 LI	1 mes	+	+	+	+
		3 meses	+	+	+	+
	250 LI	1 mes	+	+	+	+
		3 meses	+	+	+	+
	500 LI	1 mes	+	+	+	+
		3 meses	+	+	+	+

La figura 24 muestra los resultados obtenidos del Dot-ELISA con sueros de ratas Long Evans adultas (a) y sueros de ratones Balb/c adultos con IgG (b).

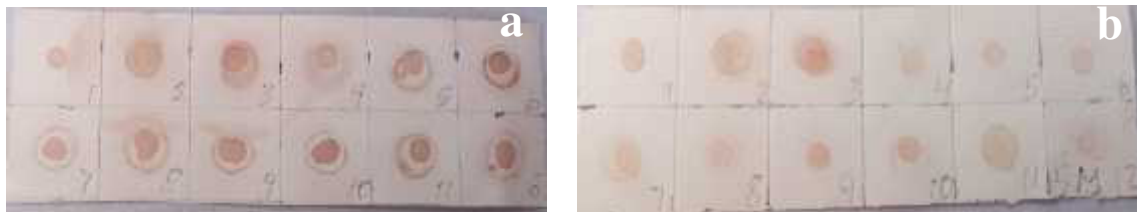


Figura 24. Dot.ELISA con sueros de ratas y ratones adultos infectados con LI de *T. spiralis*. Se muestra la técnica de Dot-ELISA con sueros de ratas Long Evans (a) y ratones Balb/c adultos (b) con IgG.

Inmunofluorescencia con sueros de ratas y ratones adultos

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica que utiliza anticuerpos fluorescentes para observar la reacción antígeno-anticuerpo. La tabla 7 muestra los resultados de las LI de *T. spiralis* tratadas con sueros de ratas Long Evans a los 3 meses de infección con las diferentes cargas parasitarias de *T. spiralis* con anticuerpos fluorescentes a una dilución 1:500.

Tabla 7

Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonal, IgG e IgA con sueros de ratas Long Evans adultas infectadas con *T. spiralis* a los 3 meses de infección

Ratas adultas				
		Policlonal	IgG	IgA
Control -		a -	b-	c -
Control +				
500 LI	3 meses	+	+	+
750 LI	3 meses	+	+	+
1000 LI	3 meses	+	+	+

La figura 25 muestra los resultados de las LI de *T. spiralis* tratadas con sueros de ratas Long Evans a los 3 meses de infección con las diferentes cargas parasitarias de *T. spiralis* con anticuerpos fluorescentes a una dilución 1:500.







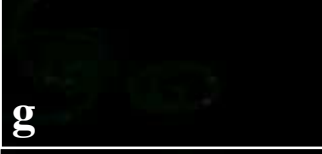
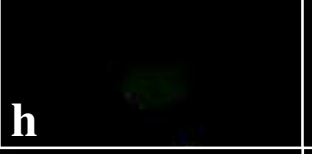


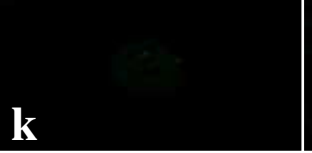

	Policlonal	IgG	IgA
Control -	 a	 b	 c
500 LI 3 meses	 d	 e	 f
750 LI 3 meses	 g	 h	 i
1000 LI 3 meses	 j	 k	 l

Figura 25. IFI con anticuerpos policlonal, IgG e IgA en sueros de ratas Long Evans adultas infectadas con *T. spiralis*. Se muestra la técnica de IFI donde se tienen sueros de ratas adultas infectadas con *T. spiralis*, a, b y c sueros negativos de ratas, d, e y f son sueros de ratas Long Evans adultas con 3 meses de infección con 500 LI de *T. spiralis*, g, h e i sueros de ratas Long Evans adultas con 3 mes de infección con 750 LI de *T. spiralis*, j, k y l sueros de ratas Long Evans adultas con 3 meses de infección con 1000 LI de *T. spiralis* vistas a 40x en el microscopio confocal.

La tabla 8 muestra los resultados de las LI de *T. spiralis* tratadas con sueros de ratones Balb/c a los 3 meses de infección con las diferentes cargas parasitarias de *T. spiralis* con anticuerpos fluorescentes a una dilución 1:500.

Tabla 8

Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgA, IgM e IgG con sueros de ratones Balb/c adultos infectados con *T. spiralis* a los 3 meses de infección

Ratones adultos				
		IgA	IgM	IgG
Control -		-	-	-
Control +				
125 LI	3 meses	-	+	+
250 LI	3 meses	-	+	+
500 LI	3 meses	-	+	+

La figura 26 muestra los resultados de las LI de *T. spiralis* tratadas con sueros de ratones Balb/c a los 3 meses de infección con las diferentes cargas parasitarias de *T. spiralis* con anticuerpos fluorescentes a una dilución 1:500.


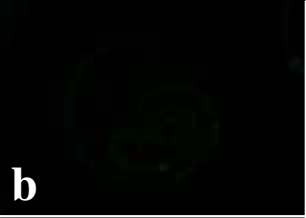



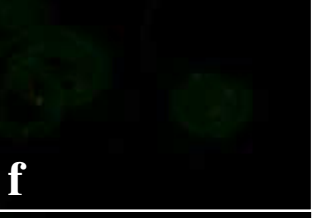
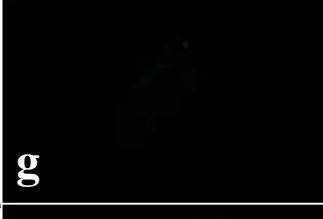

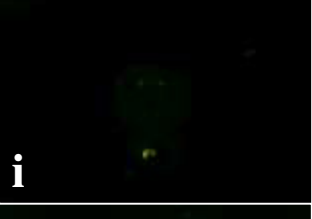



	IgA	IgM	IgG
Control -	 a	 b	 c
125 LI 3 meses	 d	 e	 f
250 LI 3 meses	 g	 h	 i
500 LI 3 meses	 j	 k	 l

Figura 26. IFI con IgA, IgM e IgG en sueros de ratones Balb/c adultos infectados con *T. spiralis*. Se muestra la técnica de IFI con sueros de ratones Balb/c adultos infectados con *T. spiralis*, a, b y c son sueros negativos de ratones, d, e y f sueros de ratones con 3 meses de infección con 125 LI de *T. spiralis*, g, h e i sueros de ratones Balb/c adultos con 3 meses de infección con 250 LI de *T. spiralis*, j, k y l son sueros de ratones Balb/c adultos con 3 meses de infección con 500 LI de *T. spiralis* vistos a 40x en el microscopio confocal.

Histología de animales retados

D. Productos retados con *T. spiralis*

La figura 27 muestra tejido de pierna de ratas Long Evans adultas y retadas con las diferentes cargas parasitarias, en las imágenes a y b son tejidos de ratas con 500 LI, en c y d ratas con 750 LI, en e y f ratas con 1000 LI de *T. spiralis*. Las imágenes (a, c y e), son tejidos de ratas adultas, donde se muestra poca reacción inflamatoria alrededor del quiste, y las imágenes (b, d y f), son tejidos de ratas retadas, (b) se observan quistes con abscesos, hialinizados, y con reacción inflamatoria aguda alrededor, (d) se muestra que alrededor de los quistes hay reacción inflamatoria crónica y (f) se ve elevada presencia de quistes con abscesos, hialinizados, y con reacción inflamatoria crónica y aguda.

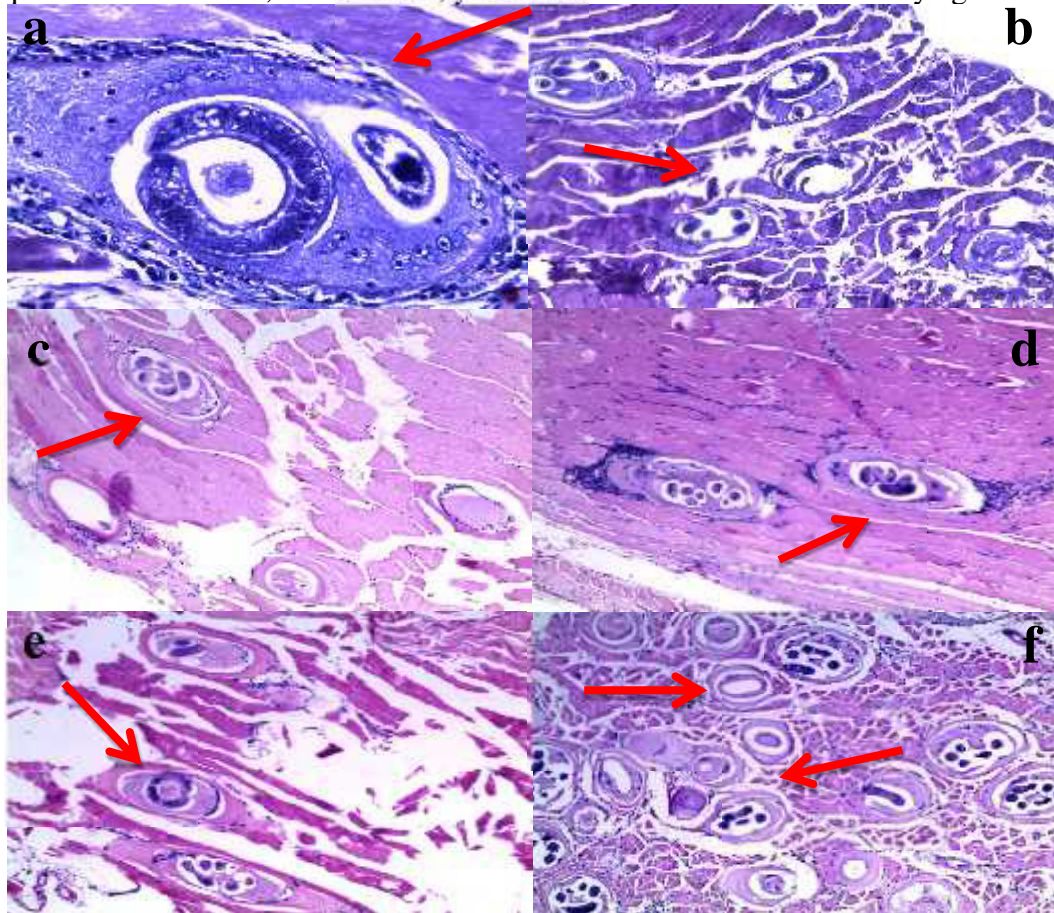


Figura 27. Tejidos del grupo de ratas adultas y retadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis*. Se muestran tejidos del grupo de ratas Long Evans adultas y retadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde (a) Pierna 40x de ratas Long Evans adultas 500 LI, (b) Pierna 10x de ratas Long Evans retadas con 500 LI de *T. spiralis*, (c) Pierna 10x de ratas Long Evans adultas 750 LI, (d) Pierna 10x de ratas Long Evans retadas con 750 LI de *T. spiralis*, (e) Pierna 10x de ratas Long Evans adultas 1000 LI, (f) Pierna 10x de ratas Long Evans retadas con 1000 LI de *T. spiralis*.

La figura 28 muestra tejido de pierna de ratones Balb/c adultos y retados con las diferentes cargas parasitarias, en las imágenes a y b son tejidos de ratones con 125 LI, en c y d ratones con 250 LI de *T. spiralis*. Las imágenes (a y c), son tejidos de ratones adultos, donde se muestra poca reacción inflamatoria alrededor del quiste, y las imágenes (b y d), son tejidos de ratones retados, (b) se presentan quistes con abscesos, hialinizados y con reacción inflamatoria aguda alrededor de los quistes de *T. spiralis*, (d) se presentan quistes esclerosados y con reacción inflamatoria aguda alrededor de los quistes de *T. spiralis*.

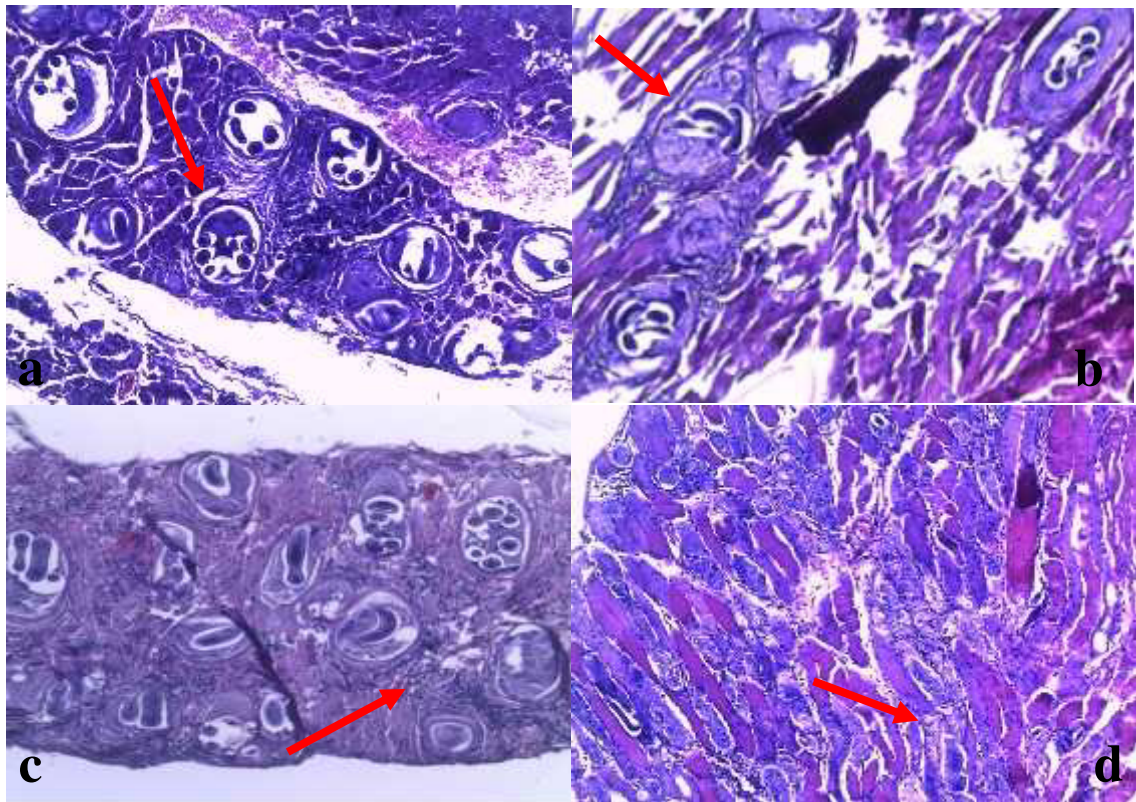
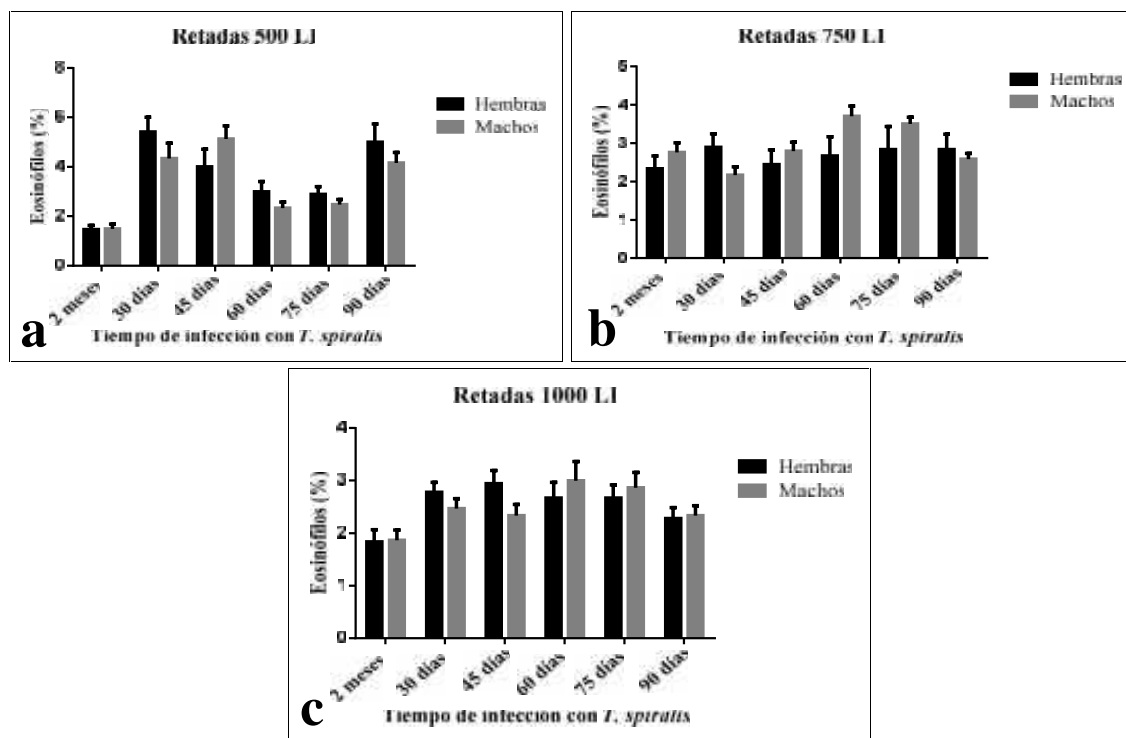


Figura 28. Tejidos del grupo de ratones retados con 125 y 250 LI de *T. spiralis*. Se muestran tejidos de ratones Balb/c retados con 125 y 250 LI de *T. spiralis* por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde (a) Pierna 10x de ratones adultos infectados con 125 LI de *T. spiralis*, (b) Pierna 10x de ratones retados con 125 LI de *T. spiralis*, (c) Pierna 10x de ratones adultos infectados con 250 LI de *T. spiralis* y (d) Pierna 4x de ratones retados con 250 LI de *T. spiralis*.

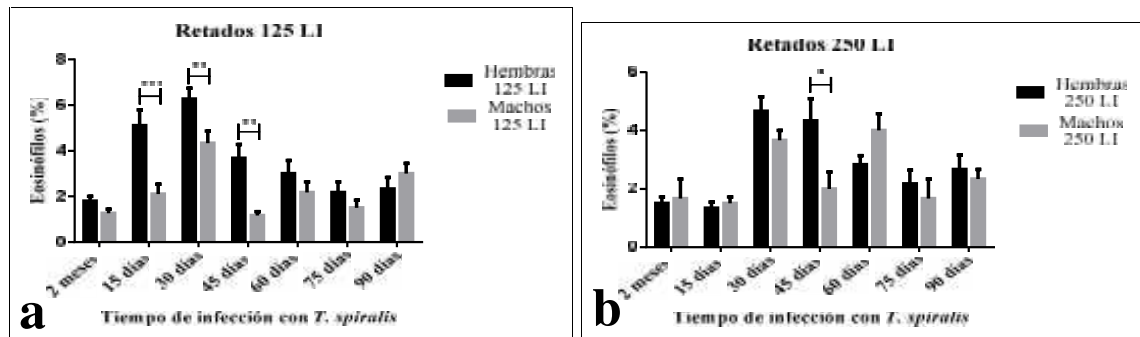
Eosinofilia de animales retados

La eosinofilia periférica se evaluó en ratas Long Evans y ratones Balb/c retados con las diferentes cargas parasitarias, la gráfica 8 muestra las diferencias entre los grupos de ratas Long Evans hembras y machos retados con 500 LI, 750 LI y 1000 LI de *T. spiralis* donde se observa que no hay diferencia significativa entre hembra y macho.



Gráfica 8. Eosinofilia periférica en ratas Long Evans retadas con *T. spiralis*. Se observa el porcentaje de eosinófilos en los diferentes grupos de ratas hembras y machos retadas con 500 (a), 750 (b) y 1000 (c) LI de *T. spiralis*.

La gráfica 9 muestra las diferencias entre los grupos de ratones Balb/c hembras y machos retados con 125 LI (a) y 250 LI (b) *T. spiralis*, donde se observa que hay diferencia significativa entre hembra y macho retados (a) con 125 LI de *T. spiralis* a los 15, 30 y 45 días de infección y entre hembra y macho retados (b) con 250 LI de *T. spiralis* a los 45 días de infección.



Gráfica 9. Eosinofilia periférica en ratones Balb/c retados con *T. spiralis*. Se observa el porcentaje de eosinófilos en los diferentes grupos de ratones hembras y machos retados con 125 (a) y 250 (b) LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

Determinación de implantación de LI de *T. spiralis* en hembras y machos retados

La figura 29 muestra los tejidos de ratas Long Evans retadas con las diferentes cargas parasitarias de LI de *T. spiralis*, las imágenes son de masetero con 500 LI (a), 750 LI (b) y 1000 LI de *T. spiralis* donde se observan las LI de *T. spiralis* junto con su cápsula bien formada pero con un puntilleo negro dentro de la colágena.

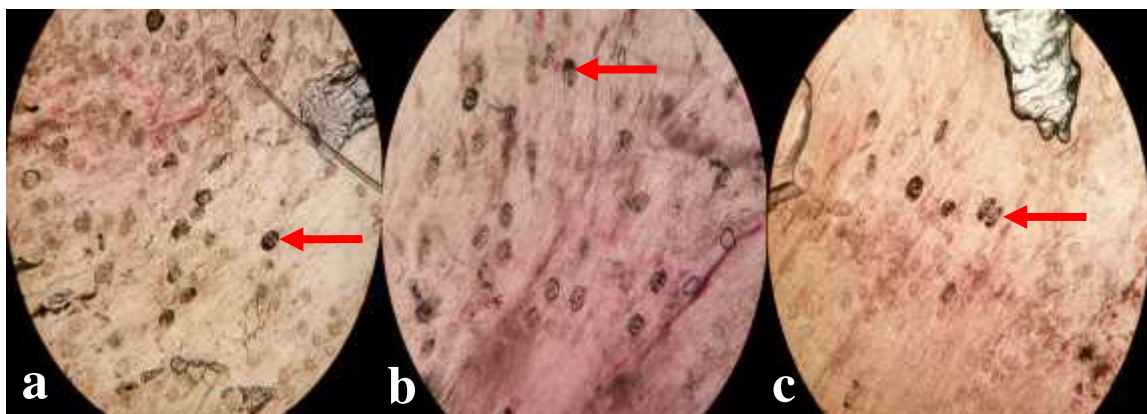
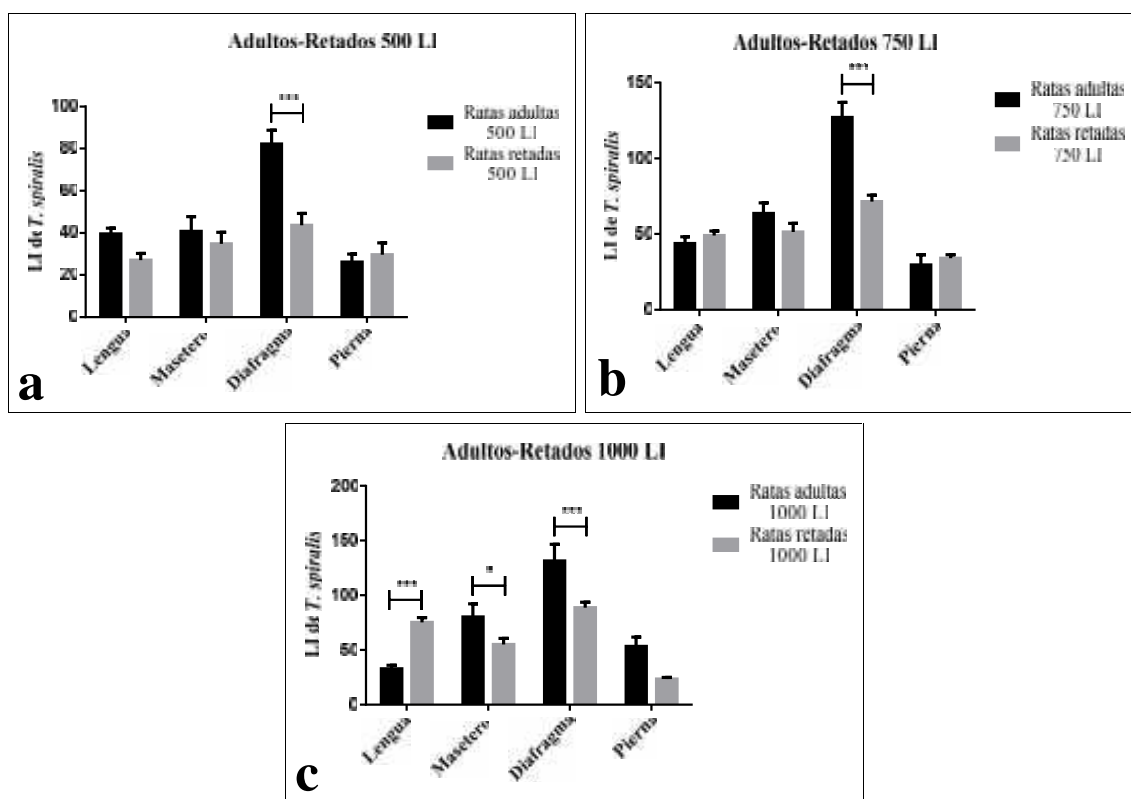


Figura 29. Tejidos musculares de ratas retadas con LI de *T. spiralis*. Se muestran mediante compresión en placa tejidos musculares de ratas Long Evans, observando masetero con 500 LI (a), 750 LI (b) y 1000 (c) LI de *T. spiralis* al microscopio óptico de luz a 4x.

En la gráfica 10 se observa de manera cuantitativa la implantación de *T. spiralis* en los animales retados con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* en ratas Long Evans en los principales tejidos donde se aloja el parásito de *T. spiralis* como es lengua, masetero, diafragma y pierna, donde se observa que las ratas retadas con 500 LI de *T. spiralis* (a) presentan diferencia significativa en la implantación de diafragma en relación con las ratas adultas con la misma infección, las ratas retadas con 750 LI de *T. spiralis* (b) presentan diferencia significativa en la implantación de diafragma en relación con las ratas adultas con la misma infección y las ratas retadas con 1000 LI de *T. spiralis* (c) presentan diferencia significativa en la implantación de lengua, masetero, diafragma y pierna en relación con las ratas adultas.



Gráfica 10. Implantación de *T. spiralis* en tejido muscular de ratas Long Evans retadas. Se observa el número de LI implantadas en los diferentes grupos de ratas retadas con 500 (a), 750 (b) y 1000 (c) LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

La figura 30 muestra los tejidos de ratones Balb/c retados con las diferentes cargas parasitarias de LI de *T. spiralis*, las imágenes son de diafragma con 125 (a) y 250 (b) LI de *T. spiralis* donde se observan las LI de *T. spiralis* junto con su cápsula bien formada pero con un puntilleo negro dentro de la colágena.

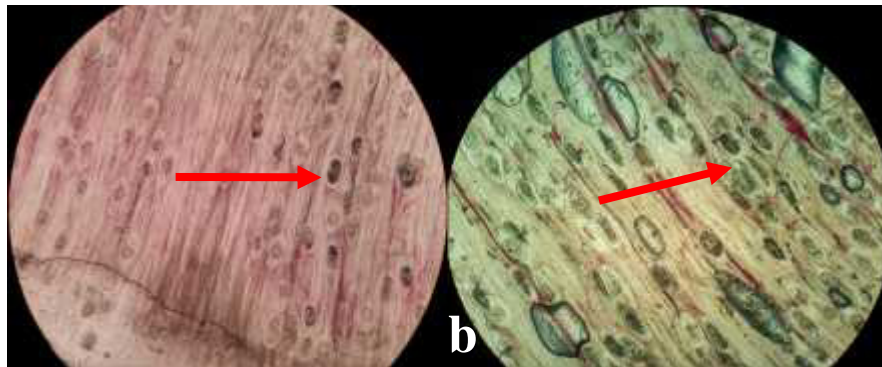
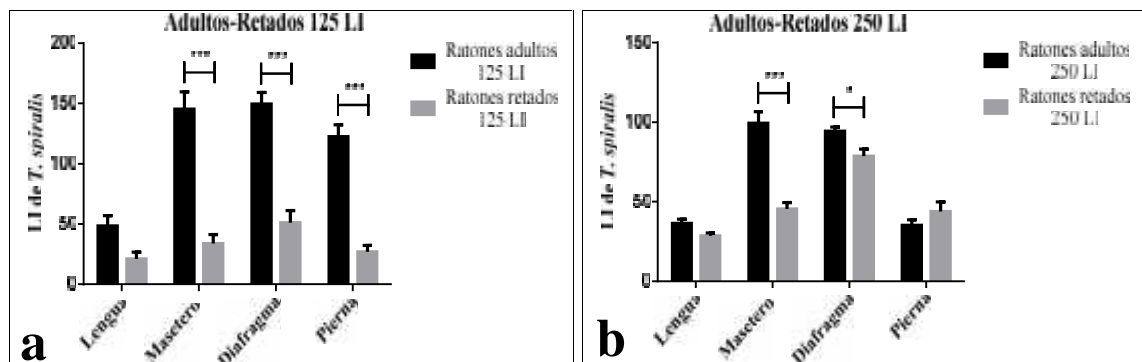


Figura 30. Tejidos musculares de ratones retados con LI de *T. spiralis*. Se muestran mediante compresión en placa tejidos musculares de ratones Balb/c, observando diafragma con 125 LI (a) y 250 (b) LI de *T. spiralis* al microscopio óptico de luz a 4x.

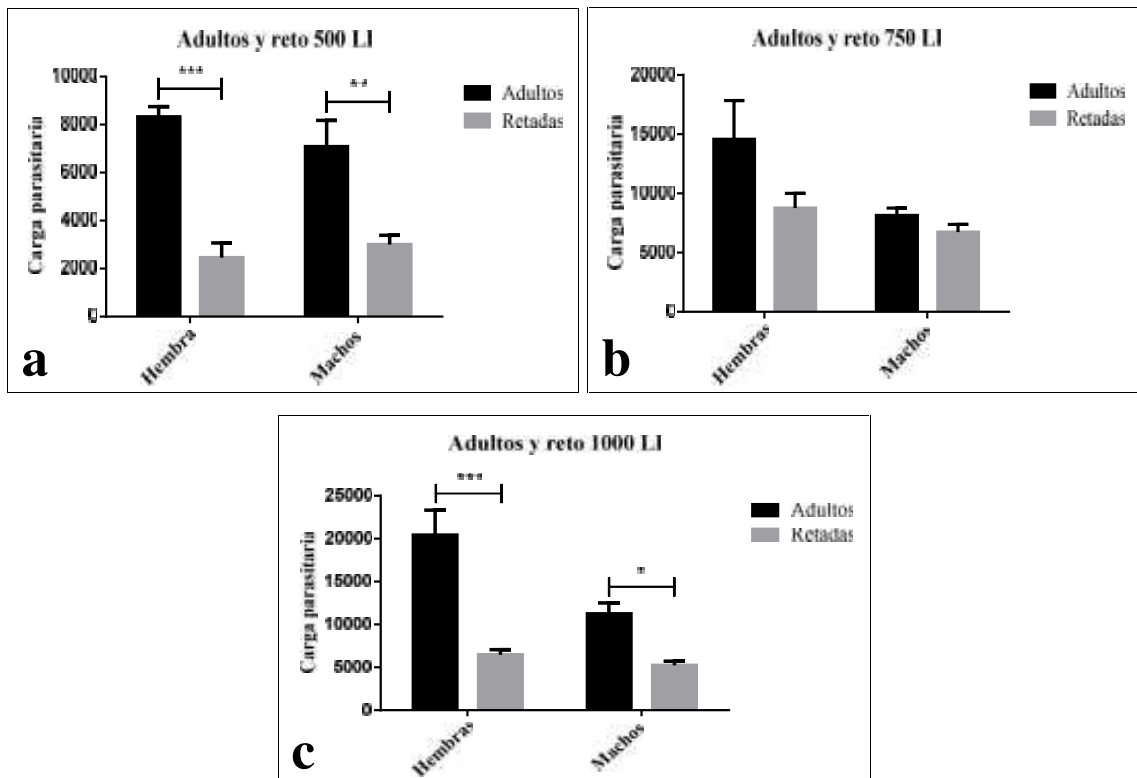
En la gráfica 11 se observa de manera cuantitativa la implantación de *T. spiralis* en los animales retados con 125 y 250 LI de *T. spiralis* en ratones Balb/c en los principales tejidos donde se aloja el parásito como es lengua, masetero, diafragma y pierna, donde se ve que los ratones retados con 125 LI de *T. spiralis* (a) presentan diferencia significativa en la implantación de masetero, diafragma y pierna en relación con los ratones adultos con la misma infección, los ratones retados con 250 LI de *T. spiralis* (b) presentan diferencia significativa en la implantación de masetero y diafragma en relación con los ratones adultos con la misma infección,



Gráfica 11. Implantación de *T. spiralis* en tejido muscular de ratones Balb/c retados. Se observa el número de LI implantadas en los diferentes grupos de ratones retados con 125 (a) y 250 (b) LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con * ($P < 0.05$) y *** ($P < 0.001$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

Cuantificación de carga parasitaria en hembras y machos retados

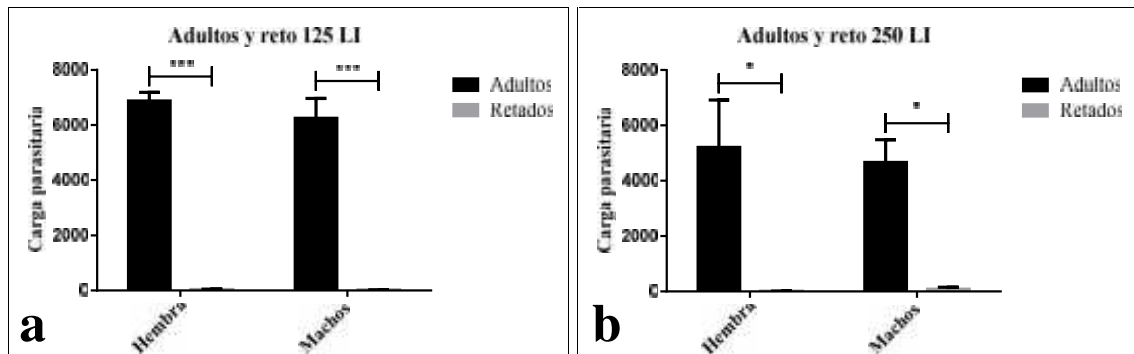
La digestión artificial de animales adultos y retados muestra que los animales que cuentan con la presencia de anticuerpos de *T. spiralis* tienen protección contra una infección de *T. spiralis*, por lo que es menor la infección y esto se observa en la gráfica 12, donde entre las ratas adultas y ratas retadas hembras de la cepa Long Evans infectadas con 500 LI (a) se tiene diferencia significativa así como entre machos adultos y machos retados, entre ratas adultas hembras y machos con ratas retadas hembras y machos infectados con 750 LI de *T. spiralis* no existe diferencia significativa, las ratas infectadas con 1000 LI presentan diferencia significativa entre hembra adulta y hembra retada, así como entre macho adulto y macho retado.



Gráfica 12. Carga parasitaria de ratas adultas y ratas retadas Long Evans. En la imagen a, se observa la diferencia entre ratas hembras adultas y retadas así como ratas machos adultos y retados infectados con 500 LI de *T. spiralis*, b ratas hembras adultas y retadas así como ratas machos adultos y retados infectados con 750 LI de *T. spiralis* y c ratas hembras adultas y retadas así como ratas machos adultos y retados infectados con 1000 LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

La gráfica 13 muestra de forma cuantitativa que entre los ratones adultos y ratones retados hembras infectados con 125 LI (a) se ve diferencia significativa así como entre machos adultos y machos retados, entre ratones adultos hembras y machos con ratones

retados hembras y machos infectados con 250 LI (b) de *T. spiralis* presentan diferencia significativa en ambos casos.



Gráfica 13. Carga parasitaria de ratones adultos y ratones retados Balb/c. En la imagen a se ve la diferencia entre ratones adultos hembras y machos con ratones retados infectados con 125 LI de *T. spiralis*, b ratones hembras adultas y retadas así como ratones machos adultos y retados infectados con 250 LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con * (P<0.05) y *** (P<0.001) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

Viabilidad con azul tripano

Por medio de la técnica de azul tripano, los tejidos de animales retados muestran que existe penetración del colorante a la célula nodriza además de ver que en esas células se encuentra un puntilleo negro, lo que permite ver que no todas las células nodrizas son viables, como se observa en la figura 31.

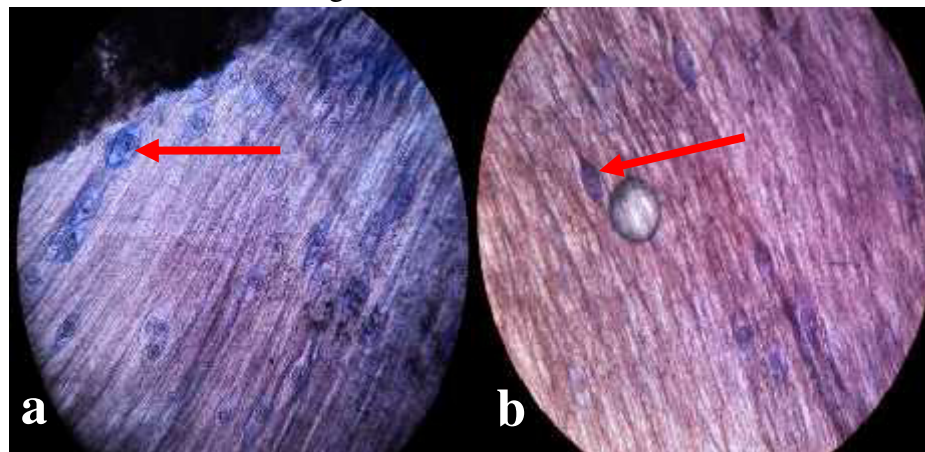


Figura 31. Tejidos musculares de animales retados teñidos con azul tripano. Se muestran tejidos musculares de ratas Long Evans y ratones Balb/c retados teñidos con azul tripano, (a) diafragma de rata con 750 LI de *T. spiralis* 4x y (b) diafragma de ratón Balb/c con 125 LI 4x, vistos al microscopio óptico de luz.

Técnica de microinmunodifusión doble (MIDD) en ratas y ratones retados

Basándonos en la microinmunodifusión doble como una técnica en la que hay interacción antígeno-anticuerpo, en los sueros de animales retados muestran que existe presencia de anticuerpos de *T. spiralis* en los animales desde los 2 meses de edad, notando ésta interacción con una marca en las laminillas como se observa en la figura 32.



Figura 32. MIDD con sueros de ratones y ratas retados con *T. spiralis*. Se muestra la técnica de MIDD con sueros de ratones Balb/c retados con 125 y 250 LI (a) y sueros de ratas Long Evans retadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* (b).

La tabla 9 muestra los resultados de las lecturas de las laminillas a las 24 y 48 horas después de haberlas montado para ver si existe la interacción antígeno-anticuerpo, donde se usan sueros de ratas hembras y machos retadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* y sueros de ratones hembras y machos retados con 125 y 250 LI de *T. spiralis*.

Tabla 9

Reacción Ag-Ac por MIDD de sueros de ratas Long Evans hembras y machos retados, así como sueros de ratones Balb/c hembras y machos retados.

Ratas y ratones retados				
		2 meses	4 meses	6 meses
	Control -	-	-	-
Ratas Long Evans	Hembras 500 LI	-	-	+
	Machos 500 LI	+	-	-
	Hembras 750 LI	+	+	+
	Machos 750 LI	+	+	+
	Hembras 1000 LI	+	+	+
	Machos 1000 LI	-	-	-
Ratones Balb/c	Hembras 125 LI	+	-	+
	Machos 125 LI	+	-	+
	Hembras 250 LI	-	-	-
	Machos 250 LI	+	-	+

Dot-ELISA en ratas y ratones retados

La tabla 10 muestra los resultados de los sueros de ratas retadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* y sueros de ratones retados con 125 y 250 LI de *T. spiralis* a los 2, 4 y 6 meses de edad.

Tabla 10

Dot-ELISA con anticuerpos policlonal, IgG, IgM e IgA con sueros de ratas Long Evans y ratones Balb/c retadas con *T. spiralis* a diferentes tiempos

Ratas y ratones retados				Policlonal	IgG	IgM	IgA
PBS			-	-	-	-	-
Control -			-	-	-	-	-
Control +			+	+	+	+	+
Ratas Long Evans	500 LI	2 meses	+	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+	+
	750 LI	2 meses	+	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+	+
	1000 LI	2 meses	+	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+	+
Ratones Balb/c	125 LI	2 meses	+	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+	-
	250 LI	2 meses	+	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+	+

La figura 33 muestra resultados representativos obtenidos del Dot-ELISA con los sueros de ratas Long Evans (a) y ratones Balb/c (b) retados con las diferentes cargas parasitarias usando IgM obteniendo la interacción antígeno-anticuerpo.

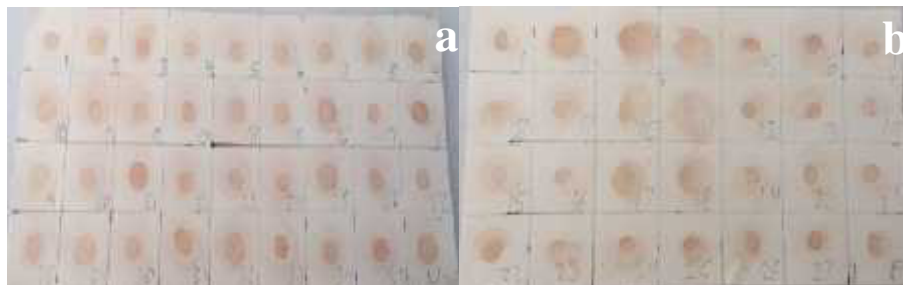


Figura 33. Dot-ELISA con sueros de ratas y ratones retados con 500, 750 y 1000 LI y 125 y 250 LI de *T. spiralis*. Se muestra la técnica de Dot-ELISA con sueros de ratas Long Evans (a) y ratones Balb/c (b) retados.

Inmunofluorescencia con sueros de ratas y ratones retados

La tabla 11 muestra los resultados de sueros de ratas retadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* a diferentes tiempos de edad.

Tabla 11

Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonal, IgG e IgA con sueros de ratas Long Evans retadas al primer y último sangrado con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis*

Ratas retadas				
		Policlonal	IgG	IgA
Control -		-	-	-
Control +				
500 LI	1 mes	+	+	+
	3 meses	+	-	-
750 LI	1 mes	+	+	+
	3 meses	+	+	+
1000 LI	1 mes	+	+	+
	3 meses	+	+	+

En la figura 34 se observan LI de *T. spiralis* tratadas con sueros de ratas Long Evans a diferentes cargas parasitarias y con anticuerpos fluorescentes a una dilución 1:500 contra LI de *T. spiralis* a los 2 y 6 meses de edad observadas al microscopio confocal.






















	IgPoliclonal	IgG	IgA
Control -	 a	 b	 c
500 LI 1 mes	 d	 e	 f
500 LI 3 meses	 g	 h	 i
750 LI 1 mes	 j	 k	 l
750 LI 3 meses	 m	 n	 o
1000 LI 1 mes	 p	 q	 r
1000 LI 3 meses	 s	 t	 u

Figura 34. IFI con anticuerpos policlonal, IgG e IgA en sueros de ratas Long Evans retadas. Se muestra la técnica de IFI donde se tienen sueros de productos de ratas retadas, a, b y c son sueros negativos de ratas tratadas con los diferentes anticuerpos, d, e y f sueros de productos de ratas retadas a la primer toma de sangre y g, h e i sueros de la última toma de sangre después del reto con 500 LI de *T. spiralis*, j, k y l sueros de productos de ratas retadas a la primer toma de sangre y m, n y o sueros de la última toma de sangre después del reto con 750 LI de *T. spiralis*, p, q y r sueros de productos de ratas retadas a la primer toma de sangre y s, t y u sueros de la última toma de sangre después del reto con 1000 LI de *T. spiralis* vistas a 40x en el microscopio confocal.

La tabla 12 muestra los resultados de sueros de ratones retados con 125 y 250 LI de *T. spiralis* a diferentes tiempos de edad.

Tabla 12

Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgA, IgM e IgG con sueros de ratones Balb/c retados a la primer y última toma de sangre con 125 y 250 LI de *T. spiralis*

Ratones retados				
		IgA	IgM	IgG
Control -		-	-	-
Control +				
125 LI	1 mes	+	+	+
	3 meses	-	+	+
250 LI	1 mes	-	+	+

La figura 35 muestra larvas tratadas con sueros de productos de ratones Balb/c retados a la primer y última toma de sangre infectados con 125 y 250 LI de *T. spiralis*.

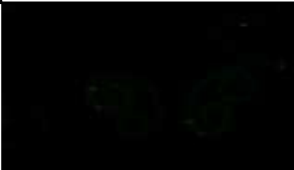





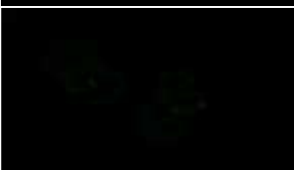
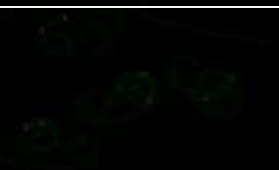
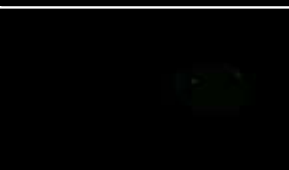
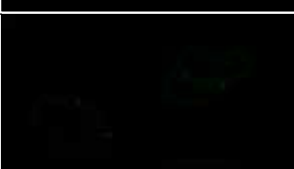
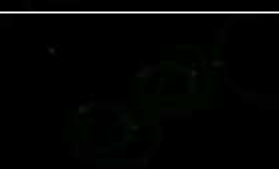
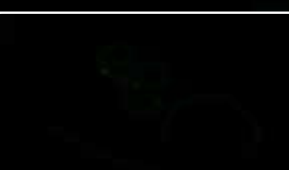
	IgA	IgM	IgG
Control -			
125 LI 1 mes			
125 LI 3 meses			
250 LI 1 mes			

Figura 35. IFI con anticuerpos IgA, IgM e IgG en sueros de ratones Balb/c retados. Se muestra la técnica de IFI donde se tienen sueros de productos de ratones retados, las imágenes a, b y c son sueros negativos de ratones tratados con los diferentes anticuerpos, d, e y f sueros de productos de ratones retados a la primer toma de sangre, g, h e i sueros de la última toma de sangre después del reto con 125 LI de *T. spiralis*, j, k y l sueros de productos de ratones retados a la primer toma de sangre después del reto con 250 LI de *T. spiralis* vistas a 40x en el microscopio confocal.

Histología de animales de seguimiento

E. Productos de seguimiento

La figura 36 muestra cortes histológicos de los productos de seguimiento tanto ratas Long Evans como ratones Balb/c, los cuales son productos de padres infectados con las diferentes cargas parasitarias, (a) se observa la trompa uterina con su músculo liso y estroma normal sin problema, (b) útero donde se ve el epitelio cilíndrico normal, (c, d, e y f) corresponde a masetero, pierna, lengua y diafragma, que son músculos estriados los cuales no muestran alteración alguna.

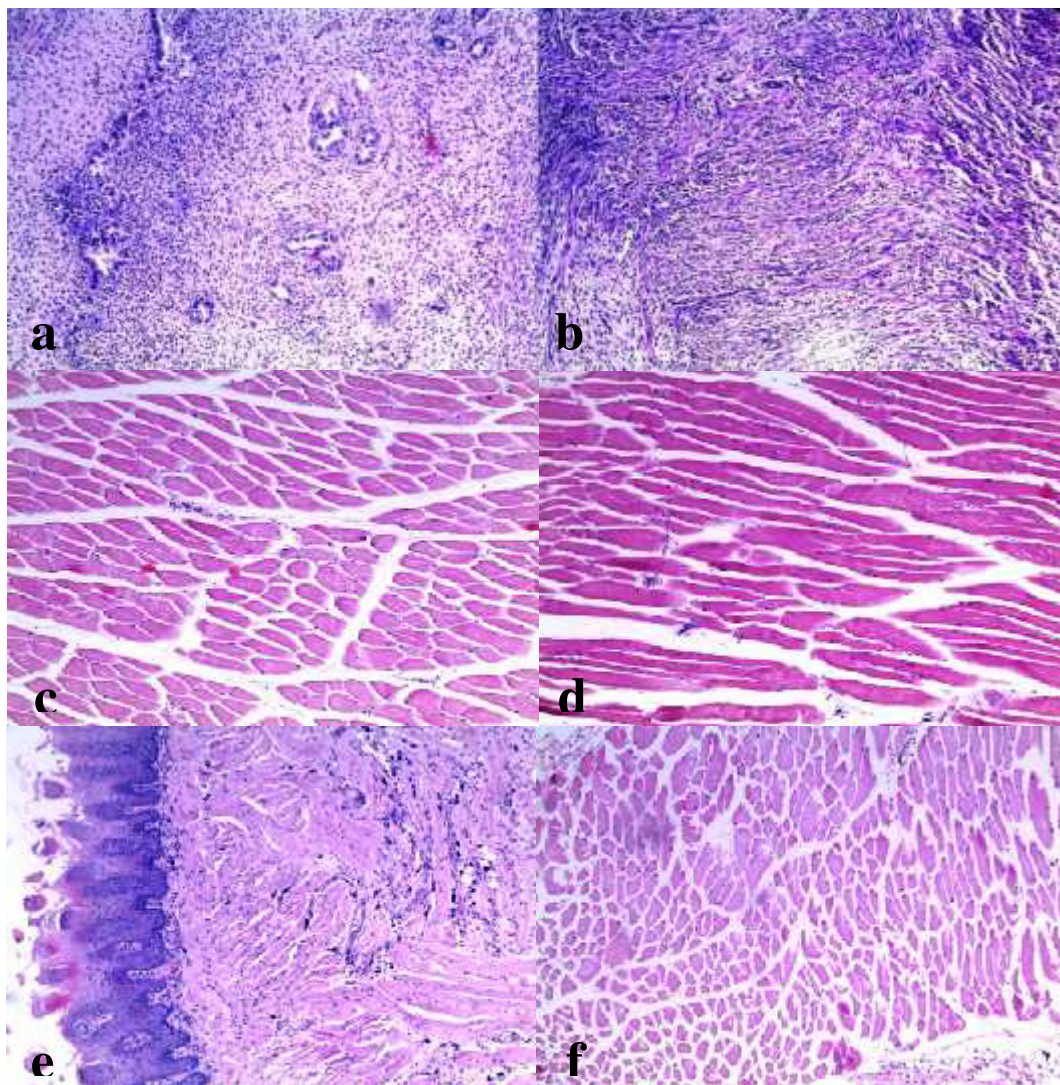
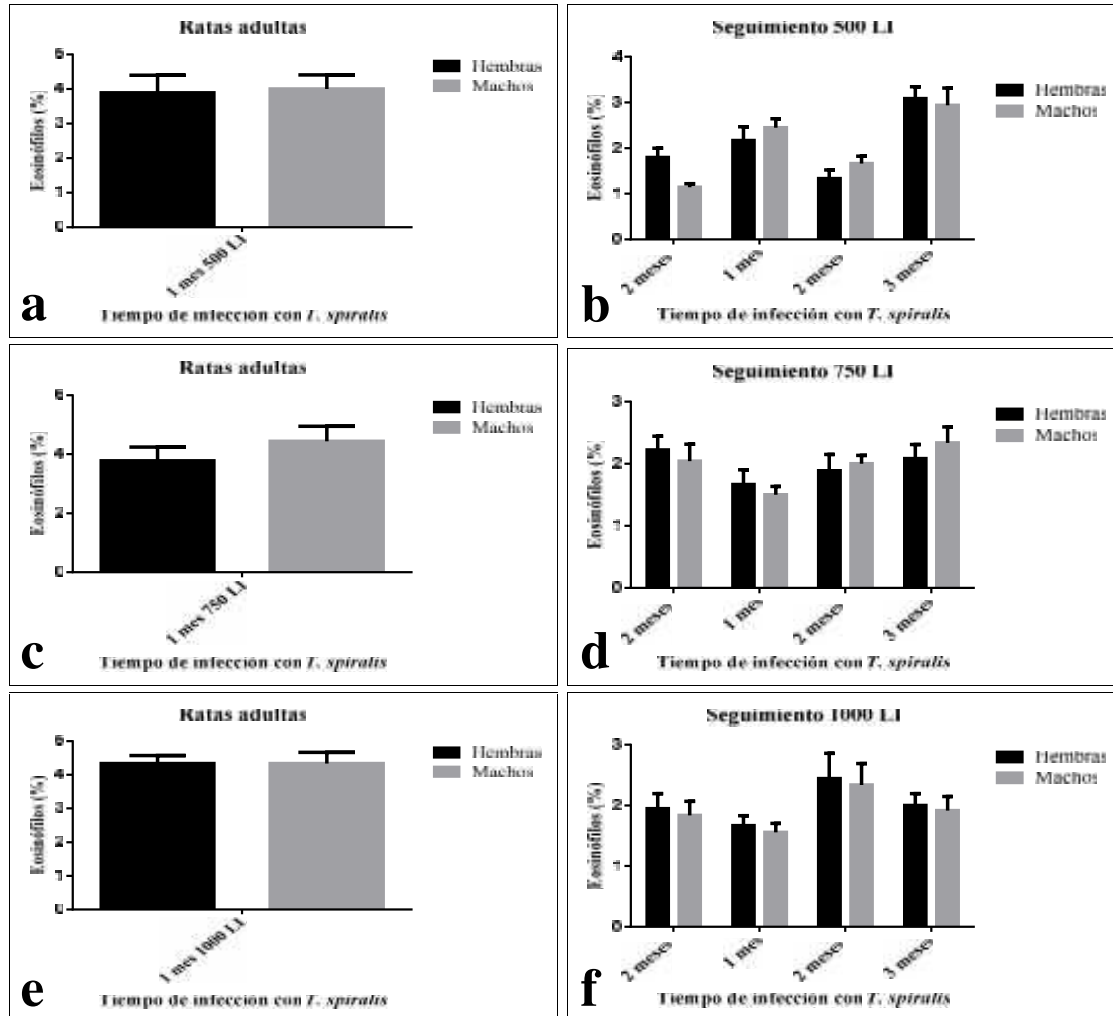


Figura 36. Tejidos del grupo de ratas y ratones de seguimiento. Se muestran tejidos del grupo de ratas y ratones de seguimiento por la técnica H-E observados al microscopio óptico de luz donde (a) Trompa uterina 4x, (b) Útero 4x, (c) Masetero 10x, (d) Pierna 10x, (e) Lengua 4x, (f) Diafragma 10x.

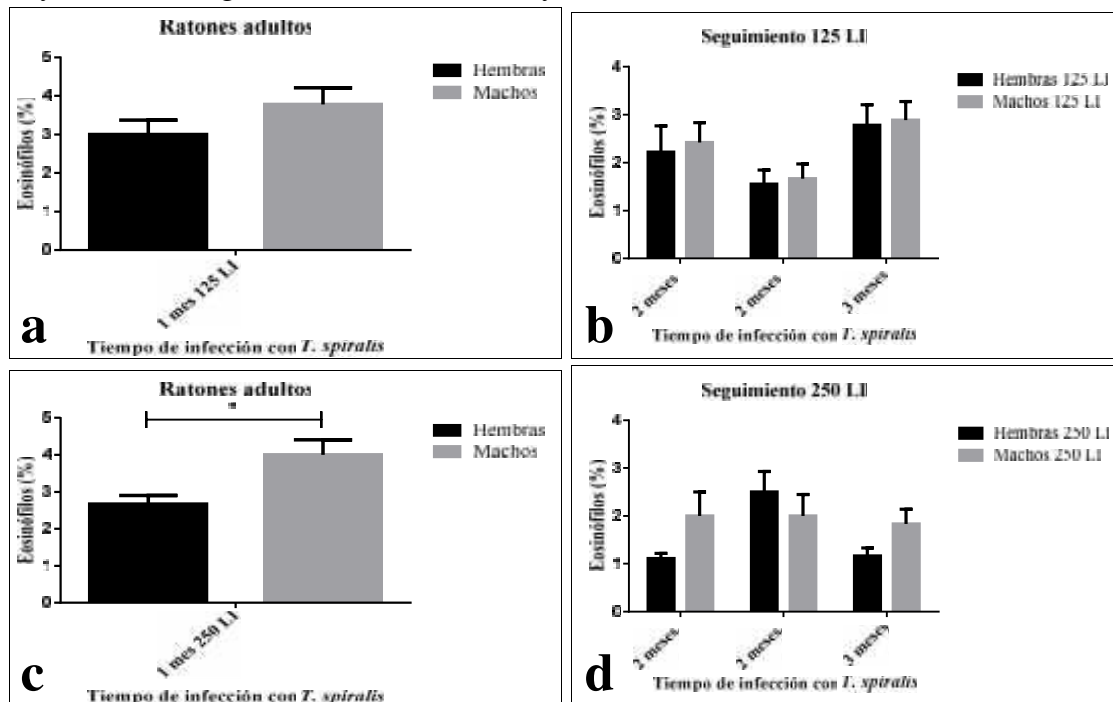
Eosinofilia de animales de seguimiento

La gráfica 14 muestra las diferencias entre los grupos de ratas Long Evans hembras y machos de seguimiento con las diferentes cargas parasitarias donde se observa que no hay diferencia significativa entre hembra y macho con la misma infección.



Gráfica 14. Eosinofilia periférica en ratas Long Evans de seguimiento. Se observa el porcentaje de eosinófilos en los diferentes grupos de ratas hembras y machos adultas infectadas con 500 (a), 750 (c) y 1000 LI de *T. spiralis* (e) y ratas de seguimiento nacidas de padres infectados con 500 (b), 750 (d) y 1000 (f) LI de *T. spiralis*.

La gráfica 15 muestra las diferencias entre los grupos de ratones Balb/c hembras y machos de seguimiento con las diferentes cargas parasitarias donde se observa que no hay diferencia significativa entre hembra y macho con la misma infección.



Gráfica 15. Eosinofilia periférica en ratones Balb/c de seguimiento. Se observa el porcentaje de eosinófilos en los diferentes grupos de ratones hembras y machos adultos infectados con 125 (a) y 250 LI de *T. spiralis* y ratones de seguimiento nacidos de padres infectados con 125 (b) y 250 (d) LI de *T. spiralis*. Las diferencias estadísticamente significativas entre macho y hembra son marcadas con * ($P < 0.05$) obtenidos mediante el análisis de Two way ANOVA (GraphPad Prism 6).

Técnica de microinmunodifusión doble (MIDD) en ratas y ratones de seguimiento

En la figura 37 se observa la interacción antígeno-anticuerpo de diferentes sueros de ratas y ratones de seguimiento.



Figura 37. MIDD con sueros de ratas y ratones de seguimiento. Se muestra la técnica de MIDD con sueros de ratas Long Evans y ratones Balb/c de seguimiento de padres infectados con 500, 750 y 1000 LI en ratas (b) y 125 y 250 LI en ratones (a).

En la tabla 13 se muestra los resultados de las lecturas de las laminillas a las 24 y 48 horas después de haberlas montado para ver si existe la interacción antígeno-anticuerpo, donde se usan sueros de ratas hembras y machos productos de seguimiento de padres

infectados con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* y sueros de ratones hembras y machos productos de seguimiento de padres infectados con 125 y 250 LI de *T. spiralis*.

Tabla 13

Reacción Ag-Ac por MIDD de sueros de productos de ratas Long Evans hembras y machos de seguimiento, así como ratones Balb/c hembras y machos de seguimiento

Ratas y ratones de seguimiento			
		2 meses	4 meses
Ratas Long Evans	Control -	-	-
	Hembras 500 LI	+	+
	Machos 500 LI	-	-
	Hembras 750 LI	+	+
	Machos 750 LI	+	+
	Hembras 1000 LI	+	+
	Machos 1000 LI	+	+
Ratones Balb/c	Control -	-	-
	Hembras 125 LI	+	-
	Machos 125 LI	+	-
	Hembras 250 LI	-	+
	Machos 250 LI	-	-

Dot-ELISA en ratas y ratones de seguimiento

La tabla 14 muestra los resultados de los sueros de ratas de seguimiento de padres infectados con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* a los 2, 4 y 6 meses de edad y sueros de ratones de seguimiento de padres infectados con 125 y 250 LI de *T. spiralis* a los 2, 4 y 6 meses de edad.

Tabla 14

Dot-ELISA con anticuerpos policlonal, IgG, IgM e IgA con sueros de ratas Long Evans y ratones Balb/c retados con *T. spiralis* a diferentes tiempos

Ratas de seguimiento			Policlonal	IgG	IgM	IgA
PBS			-	-	-	-
Control -			-	-	-	-
Control +			+	+	+	+
Ratas Long Evans	500 LI	2 meses	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+
	750 LI	2 meses	+	+	-	+
		4 meses	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+
	1000 LI	2 meses	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+
Ratones Balb/c	125 LI	2 meses	+	+	+	+
		4 meses	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+
	250 LI	2 meses	+	+	-	-
		4 meses	+	+	+	+
		6 meses	+	+	+	+

La figura 38 muestra resultados representativos obtenidos del Dot-ELISA con los sueros de ratas Long Evans (a) y ratones Balb/c (b) de seguimiento con las diferentes cargas parasitarias usando IgM obteniendo la interacción antígeno-anticuerpo.

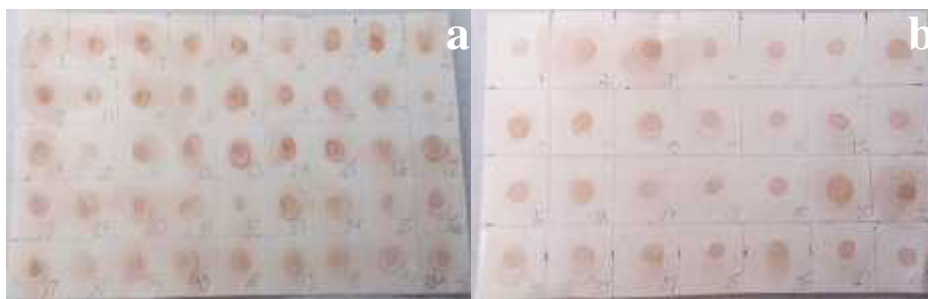


Figura 38. Dot-ELISA con sueros de ratas y ratones de seguimiento de padres infectados con 500, 750 y 1000 LI y 125 y 250 LI de *T. spiralis*. Se muestra la técnica de Dot-ELISA con sueros de ratas Long Evans (a) y ratones Balb/c (b) de seguimiento.

Inmunofluorescencia con sueros de ratas y ratones de seguimiento

La tabla 15 muestra los resultados de sueros de ratas de seguimiento de padres infectados con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* a diferentes tiempos de edad.

Tabla 15

Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonal, IgG e IgA con sueros de ratas Long Evans de seguimiento a la primer y última toma de sangre con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis*

Ratas de seguimiento				
		Policlonal	IgG	IgA
Control -		-	-	-
Control +				
500 LI	1 mes	+	+	-
	6 meses	+	+	-
750 LI	1 mes	+	-	-
	3 meses	+	+	-
1000 LI	1 mes	+	+	+
	3 meses	-	+	+

En la figura 39 se observan LI de *T. spiralis* tratadas con sueros de ratas Long Evans de seguimiento a diferentes cargas parasitarias y con anticuerpos fluorescentes a una dilución 1:500 contra LI de *T. spiralis* a los 2 y 6 meses de edad observadas al microscopio confocal.



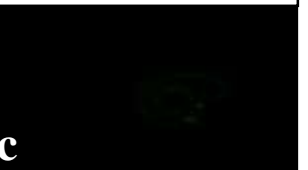







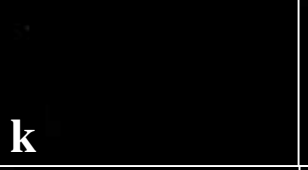




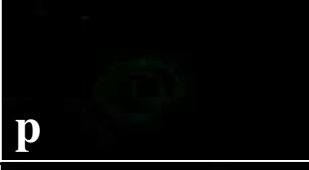





	IgPoliclonal	IgG	IgA
Control -	 a	 b	 c
500 LI 1 mes	 d	 e	 f
500 LI 6 meses	 g	 h	 i
750 LI 1 mes	 j	 k	 l
750 LI 3 meses	 m	 n	 o
1000 LI 1 mes	 p	 q	 r
1000 LI 3 meses	 s	 t	 u

Figura 39. IFI con anticuerpos policlonal, IgG e IgA en sueros de ratas Long Evans de seguimiento. Se muestra la técnica de IFI en sueros de productos de ratas de seguimiento, a, b y c son sueros negativos de ratas tratados con los diferentes anticuerpos, d, e y f sueros de productos de ratas a la primer toma de sangre y g, h e i sueros de la última toma de sangre con 500 LI de *T. spiralis*, j, k y l sueros de productos de ratas a la primer toma de sangre y m, n y o sueros de la última toma de sangre con 750 LI de *T. spiralis*, p, q y r sueros de productos de ratas a la primer toma de sangre y s, t y u sueros de la última toma de sangre con 1000 LI de *T. spiralis* vistas a 40x en el microscopio confocal.

La tabla 16 muestra los resultados de sueros de ratones de seguimiento de 125 y 250 LI de *T. spiralis* a diferentes tiempos de edad.

Tabla 16

Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgA, IgM e IgG con sueros de ratones Balb/c de seguimiento a la primer y última toma de sangre con 125 y 250 LI de *T. spiralis*

Ratones de seguimiento				
		IgA	IgM	IgG
Control -		-	-	-
Control +				
125 LI	1 mes	+	+	+
	6 meses	-	-	+
250 LI	1 mes	+	+	+
	3 meses	-	-	+

La figura 40 muestra larvas tratadas con sueros de productos de ratones Balb/c de seguimiento a la primer y última toma de sangre con 125 y 250 LI de *T. spiralis*.







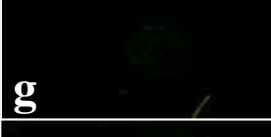
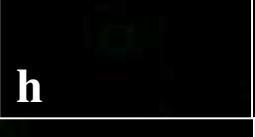
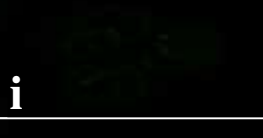
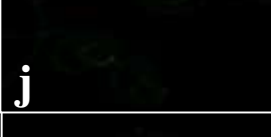
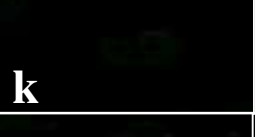

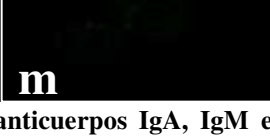
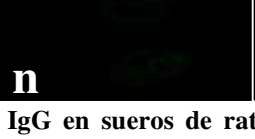

	IgA	IgM	IgG
Control -			
125 LI 1 mes			
125 LI 6 meses			
250 LI 1 mes			
250 LI 3 meses			

Figura 40. IFI con anticuerpos IgA, IgM e IgG en sueros de ratones Balb/c de seguimiento. Se muestra la técnica de IFI donde se tienen sueros de productos de ratones de seguimiento, las imágenes a, b y c son sueros negativos de ratones tratados con los diferentes anticuerpos, d, e y f sueros de productos de ratones a la primer toma de sangre, g, h e i sueros de la última toma de sangre con 125 LI de *T. spiralis*, j, k y l sueros de productos de ratones a la primer toma de sangre, m, n y o sueros de la última toma de sangre con 250 LI de *T. spiralis* vistas a 40x en el microscopio confocal.

En el sacrificio de los productos de ratas Long Evans de seguimiento nacidas de padres infectados con 1000 LI de *T. spiralis* que fueron 5 hembras y 4 machos, sólo se encontraron LI de *T. spiralis* en diferentes tejidos de las hembras, se hicieron lecturas en 3 campos y se obtuvo que en la hembra 1 se encontró 1 LI en diafragma, en la hembra 2 y 3 no se encontraron LI, en la hembra 4 se encontraron en masetero 1 LI, pierna 2 LI y diafragma 3 LI, y en la hembra 5 se encontró en pierna 1 LI de *T. spiralis*.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado fue utilizando 2 cepas de modelos murinos, ratas Long Evans infectadas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* y ratones Balb/c infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis*, se realizó en animales que fueron gestados para evaluar en sus productos el paso de anticuerpos y su efecto protector se ha estudiado en diferentes especies como los perros, gatos y el hombre entre otras, el paso de anticuerpos de la madre al producto permite la protección contra diferentes patógenos (Chappuis, 1998). Mediante estos estudios se hace el planteamiento del siguiente proyecto, el cual fue evaluado por técnicas directas e indirectas.

Los resultados obtenidos indican que la infección con la que se manejan los animales genera un efecto sobre el número de productos que lleguen a tener, a diferencia de los resultados obtenidos por Moreno *et al.*, 2008 que reportan que la infección por *T. spiralis* debió influir en el número de crías ya que tuvieron una variación entre sus grupos, donde en los grupos infectados se obtuvieron un promedio general de 13 crías por rata los cuales difirieron con el control sano, donde las ratas de este grupo tuvieron un promedio de 18 crías por rata, los resultados del presente trabajo indican que conforme sea mayor la infección, menor será el número de productos que éstos tengan, proceso que se observa en los ratones Balb/c, ya que en este modelo murino sí existe diferencia en el número de productos, los ratones Balb/c generan mayor protección con el paso de anticuerpos a diferencia de las ratas Long Evans, ya que las ratas sanas tuvieron de 12 a 14 productos por cada una, las infectadas con 500 tuvieron de 9 a 11 productos, las de 750 tuvieron 11 productos y las que fueron infectadas con 1000 LI de *T. spiralis* tuvieron de 8 a 12 productos, los ratones sanos tuvieron de 9 hasta 15 productos, los infectados con 125 tuvieron de 5 hasta 12 productos, los de 250 tuvieron de 2 a 4 productos y los infectados con 500 LI de *T. spiralis* tuvieron de 1 a 3 productos, los resultados también dejan ver que los productos no presentan malformaciones generadas por la presencia del parásito y ni por la cantidad de LI con la que fueron infectados, a diferencia de lo que pasa con *Listeria monocytogenes*, Larraín *et al.*, 2008 reporta al bacilo gram positivo como organismo de frecuente consumo en agua o

alimentos contaminados, afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos y a embarazadas, en estas últimas tiene especial capacidad para producir infección fetal determinando cuadros severos y de alta mortalidad perinatal.

La tinción con H-E de tejidos de animales sanos no presenta alteración ni inflamación, los tejidos de animales adultos ratas y ratones con las diferentes cargas parasitarias presentan quistes normales de LI de *T. spiralis* con presencia de reacción inflamatoria aguda y crónica, el número de LI en los tejidos depende de la cantidad de infección, los tejidos de los productos retados presentan quistes con abscesos, hialinizados y reacción aguda y crónica a su alrededor, los efectos que se ven en los animales retados son efectos que se tienen al usar tratamiento con medicamentos como lo obtenido por Muñoz en el 2013 cuando se trató animales infectados con resiniferatoxina y se observó en algunas de ellas proceso de involución, hialinizadas y degradadas, también en el estudio de Chávez *et al.*, 2006 donde se trató con albendazol a los animales infectados y al usar la tinción con Hematoxilina-Eosina de los tejidos de éstos animales, se observó una gran cantidad de polimorfo nucleares consumiendo el material necrótico, y otra célula en proceso de resolución, los tejidos de productos de ratas y ratones de seguimiento se observan normales, los músculos estriados no presentan ninguna alteración.

Moreno *et al.*, 2012 evalúan inmunógenos en murinos, estudio que presenta un efecto protector y al momento de realizar la técnica de H-E, encontraron LI de *T. spiralis* viables con modificaciones, lo cual concuerda con los resultados de este estudio ya que los tejidos de los animales que fueron retados presentan modificaciones, quistes hialinizados y con abscesos.

La eosinofilia se ha establecido como una reacción a una parasitosis provocada por nemátodos, la cual se establece entre un 5% hasta un 50% desde el inicio de la infección (Despommier *et al.*, 2005), nuestros resultados muestran que al mes de infección de ratas Long-Evans adultas comparados con el control sano existe un aumento en la producción de eosinófilos debido a la infección con *T. spiralis*, los cuales entre hembra y macho infectados con la misma carga parasitaria no presentan diferencia significativa,

en el caso de los ratones adultos Balb/c también se observa el incremento de eosinófilos al mes de infección comparando con el control sano, además se observa que entre hembras y machos infectados con 250 y 500 LI de *T. spiralis* se tiene una respuesta diferente por lo que se observa diferencia significativa entre sexos, Muñoz *et al.*, 2013 obtuvieron como resultado que desde el inicio de la infección y hasta la segunda semana de infección fue cuando se tuvo el punto máximo de la infección por *T. spiralis*, lo observado en animales retados manifiesta un pico de infección a los 30 días después del reto y esa elevación de eosinófilos se mantuvo hasta los 75 días del reto en ratas Long-Evans, en el caso de los ratones Balb/c retados, se obtiene que a los 30 días se ve el aumento en eosinófilos y se mantiene hasta los 45 días, después el nivel de eosinófilos es basal en los ratones, Ortiz en el 2013, da a conocer que en la fase invasora o migratoria de las helmintiasis, la eosinofilia es elevada mientras exista una respuesta tisular inflamatoria, dicha reacción es la que observamos en el estudio realizado en los animales retados. Los animales que fueron productos de padres infectados con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* para el caso de ratas y 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis* en el caso de ratones se observó que no existe diferencia significativa entre hembras y machos productos de padres de ratas infectadas con 500, 750 y 1000 LI *T. spiralis*, ni entre hembras y machos productos de padres de ratones infectados con 125, 250 y 500 LI de *T. spiralis*, los niveles de eosinófilos se encuentran basales.

La inducción de una inmunidad que genera protección sobre las ratas y los ratones, es el efecto que se busca con el uso de vacunas, en estudios anteriores, como Moreno *et al.*, 2012 en su estudio donde utilizaron 3 inmunógenos mostró que el AST de *T. spiralis* genera un efecto protector el cual en la compresión en placa nos muestra alteraciones en la célula nodriza, se pierde su forma característica de espiral y la célula nodriza se modifica, Laredo *et al.*, 2012 también inmunizó ratas Long Evans con AST para ver las modificaciones de la célula nodriza mediante la compresión en placa, lo que arroja como resultado que se tuvo un efecto de protección total con el AST y posterior a la infección con *T. spiralis* hubo una disminución de LI, las modificaciones en la célula nodriza de *T. spiralis* en tejidos de rata Long Evans inmunizadas con AST y sacrificadas en diferentes tiempos fue evidente con las técnicas directas de se observa cómo la *T. spiralis* pierde su

enquistamiento, su espiral y se encuentra fragmentada por lo que ya no es viable y Maldonado *et al.*, 2007 observaron en ratas desnutridas inmunizadas con inmunógeno de 45 kDa e infectadas con *T. spiralis*, que la célula nodriza de *T. spiralis* tiene modificaciones, demostrando que el inmunógeno de 45 kDa en animales nutridos tuvo un efecto de protección total ya que posterior a la infección no se encontró el parásito y en animales desnutridos disminuyó la carga parasitaria pero si permitió el desarrollo del parásito, y en este estudio se observa mediante el uso de técnicas directas al parásito de *T. spiralis* directamente y mediante la compresión en placa vimos que la implantación en ratas adultas sacrificadas a los tres meses tiene una relación en las infecciones de 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* ya que los resultados arrojaron que a nivel de masetero hay diferencia significativa al igual que la implantación del parásito en masetero de ratones adultos fue lo mismo, en ambos modelos, las hembras son las que presentan una mayor implantación en los tejidos a diferencia de los machos, las ratas adultas infectadas con 1000 LI de *T. spiralis* también presentan diferencia significativa entre diafragma y pierna de hembras y machos infectados con la misma carga parasitaria, también siendo las hembras las que presentan mayor implantación, los ratones adultos infectados con 500 LI de *T. spiralis* también presentan diferencia significativa entre lengua y diafragma de hembras y machos infectados con la misma carga parasitaria siendo las hembras las que tienen mayor implantación, en el caso de la lengua el macho es el que tuvo mayor implantación. En los productos retados tanto de ratas como de ratones se arroja que hay diferencias significativas en todos los tejidos, la mayoría de los animales concuerdan en que el diafragma es el tejido que presenta mayor disminución en la implantación, seguido de masetero, lo que hace que concordemos con Moreno *et al.*, 2012, Laredo *et al.*, 2012 y Maldonado *et al.*, 2007, ya que el reto con *T. spiralis* en los productos que nacieron de ratas y ratones infectados con diferentes cargas parasitarias ejerce la misma función de que ellos generaron al momento de inmunizar a sus animales.

Los resultados que arrojan la disminución en la implantación se relaciona con la disminución en la carga parasitaria, después de realizar la digestión artificial se aprecia que comparando la carga parasitaria de los diferentes grupos de animales adultos no tenemos diferencia significativa, es como si no se aplicara tratamiento a los grupos, pero

cuando obtenemos la carga parasitaria de los animales retados y la comparamos con la carga de los animales adultos, vemos que sí existe disminución significativa entre los productos de ratas infectadas con 500 y 1000 LI de *T. spiralis*, y en el caso de los ratones tenemos que los infectados con 125 y 250 LI de *T. spiralis* también hay disminución significativa de la carga parasitaria, lo cual se relaciona con lo que se encontró por Laredo *et al.*, 2012, donde ellos reportan que se tuvo un efecto de protección total con el AST y posterior a la infección con *T. spiralis* hubo una disminución de LI, se descubre que el estímulo antigénico que es determinado por las diferentes fases del parásito es que se produce una inmunidad general que forma anticuerpos contra los antígenos y esto hace que inhiba el desarrollo normal del parásito. Los tejidos que fueron usados para determinar la implantación del parásito fueron tratados con azul tripano para evaluar la viabilidad de las células implantadas en los tejidos, y se obtuvo que los tejidos de los animales adultos no tuvieron penetración del colorante a las células nodrizas demostrando así el valor elevado en carga parasitaria a diferencia de los tejidos de los productos retados que presentaban un puntilleo negro y al colocar el colorante éste penetró a la célula dejando ver que las células no son viables, la viabilidad en la LI también fue identificada con el colorante azul tripano, y el mismo efecto que se obtuvo en los tejidos se tuvo en las LI, las LI de animales adultos no tuvieron penetración de colorante y las LI de los productos retados si tuvieron penetración del colorante, lo cual nos hace ver que la protección generada por la madre al producto provoca el mismo efecto que el antiparasitario de mayor efecto como lo menciona Chávez *et al.*, 2006, donde mencionan que este fármaco genera cambios en la célula nodriza, lo cual puede provocar una disminución de larvas y células nodrizas viables.

Dubinsky *et al.*, 2001, sugieren que las LI penetran al feto y éste siguió creciendo, sin embargo se observaron larvas no encapsuladas, el tratamiento de la madre mató a las larvas y muy probablemente contribuyó a la modificación de la estructura morfológica y a la desintegración de la estructura interna de las LI, en el presente estudio no se emplearon medicamentos o alguna sustancia extraña, lo cual es motivo de que las LI que se observaron en los tejidos tengan bien identificada su forma y su estructura en la

implantación, se observó que los productos hembras de seguimiento que nacieron de ratas adultas infectadas con 1000 LI presentaron LI en diferentes tejidos al momento de tomar tejidos y hacer compresión en placa, la presencia de estas LI en una menor cantidad, Fariña *et al.*, 2016, reportan que la transmisión vertical de helmintos es universalmente materna y se manifiesta a través de mecanismos prenatales y dan a conocer que en 1916 se sugirió por primera vez la existencia de la transmisión vertical de *Trichinella spp.*, debido a un gran número de LI en la leche de una mujer que se encontraba lactando, Dubinsky *et al.*, 2001 el hallazgo de LI y partes de LI en la placenta, el contenido de las cavidades corporales, los órganos y los tejidos fetales provenientes de una mujer que resultó infectada en la semana 10 de la gestación, y que decidió practicar el aborto en la semana 22 de gestación, durante un brote por *Trichinella britovi* que tuvo lugar en 1998 en la República Eslovaca, dichos resultados no concuerdan con nuestro trabajo, porque en los cortes histológicos que se hicieron a los tejidos de trompas y úteros de los animales adultos infectados con las diferentes cargas parasitarias no se encontró la presencia de LI de *T. spiralis*, sin embargo los productos de las ratas que tenían una mayor infección son los que presentaron LI en los tejidos de elección por éste parásito, la presencia es menor a diferencia de los animales que fueron retados, pero si hay presencia de LI de *T. spiralis*, la ruta de transmisión alternativa no solo es importante en animales, sino también en seres humanos, por lo que es necesario su estudio en esta nueva especie, debido a que la placenta del ratón y del humano exhiben características anatómicas semejantes, ambas son hemocoriales, que significa que el tejido trofoblástico derivado del feto se encuentra bañado directamente por la sangre materna.

El trabajo realizado se relaciona a lo publicado por Cosoroaba y Orjanu 1998, Webster y Kapel 2005 y Cui *et al.*, 2006, los cuales encontraron LI de *T. spiralis* en las crías de hurones, cobayos, ratones CF1, BALB/c y ratas que habían sido infectados de forma experimental, antes o inmediatamente después de la concepción, lo que indica que la transmisión vertical ocurriría por un pasaje transplacentario de LI. En la infección por *T. patagoniensis*, la ausencia de recuperación de LI en crías provenientes de hembras

inoculadas en gestación tardía no descartaría la posibilidad de transmisión transplacentaria, lo que refuerza la necesidad de intensificar los estudios al respecto.

Barbera en el 2004 da a conocer que la transferencia de la memoria inmunológica de la madre al feto frente a las enfermedades más frecuentes en el entorno materno y, por tanto, a las que también es más posible que esté expuesto el recién nacido es esencial para su supervivencia, la atenuación de los procesos infecciosos o la protección frente a éstos permite a los agentes infecciosos actuar como inmunizantes en el lactante con un mínimo de riesgos, Barbera da a conocer que la transferencia al recién nacido se realiza en los humanos mediante anticuerpos del tipo IgG a través de un sistema de transporte activo placentario, aún después del parto, a través de la lactancia materna, se transmiten al lactante elementos moduladores de la respuesta inmunitaria y, principalmente, anticuerpos tipo IgA secretorios, que van actuar protegiendo al recién nacido frente a las enfermedades que tienen su vía de entrada a través de las mucosas. Vega *et al.*, 2011 en su estudio determina los títulos de anticuerpos neutralizantes desde la segunda semana hasta la octava semana de edad, donde observan que los cerdos procedentes de madres inmunizadas con el candidato vacunal de subunidad proteica E2 mostraron títulos de anticuerpos maternos significativamente superiores durante el periodo evaluado con duración de los títulos protectivos hasta las 8 semanas de edad. Herrera *et al.*, 2013, da a conocer que se sabe mucho sobre la respuesta inmunológica en el periodo neonatal, sin embargo aún hay mucho por aprender, se reporta que el uso generalizado de la gammaglobulina intravenosa puede ser de referencia al momento en que la utilización de inmunomoduladores con moléculas diversas como factores de regulación de citosinas pro-inflamatorias e incluso el factor de transferencia sean parte de nuestra labor clínica diaria, debido a eso y en base a este estudio, tomamos en cuenta el paso de anticuerpos a través de la placenta y de la lactancia materna, se emplearon técnicas indirectas (microinmunodifusión doble, el Dot-ELISA y la inmunofluorescencia indirecta) con las que se diagnosticó la presencia del parásito.

La microinmunodifusión doble es una técnica que se emplea como tamiz para determinar la presencia del anticuerpo de *T. spiralis*, y lo que se obtuvo con los sueros

probados es que en los animales adultos ratas y ratones al mes y a los tres meses de infección hay presencia de éste anticuerpo, en los sueros de productos de ratas y ratones retados hasta los 3 meses también dan positivo a la presencia de anticuerpo de *T. spiralis*, las ratas machos con 500 LI dan negativo a los 4 y 6 meses al igual que en machos con 1000 LI a los 2, 4 y 6 meses, los ratones hembras y machos con 125 LI nos dio negativo a los 4 meses y las hembras con 250 LI da negativo a los 2, 4 y 6 meses y los machos con 250 a los 4 meses, no indica que no haya presencia de anticuerpos de *T. spiralis*, sino que tal vez las concentraciones son más bajas y por eso no se puede determinar, Muñoz en el 2013 encontró que a partir de la segunda semana de infección hasta el día 28 de infección se observa la presencia de bandas de precipitación, lo cual evidencia la presencia de anticuerpos contra antígenos de *T. spiralis*.

Moreno *et al.*, 2008 indican que existe el paso de anticuerpos anti-*T. spiralis* de la madre al producto y estos tienen una permanencia hasta por ocho meses, en el presente estudio los resultados para la MIDD dieron positivo hasta el tercer mes de edad.

Salazar *et al.*, 2014, dan a conocer que los anticuerpos maternos, son de vital importancia para proteger a los lechones de una infección temprana de *Mycoplasma hyopneumoniae*, y cabe recalcar que son transmitidos de la madre al lechón por el calostro, lo cual comparado con este trabajo se demuestra que los productos generan esa protección debido a que después de nacer son amamantados por las ratas hembras hasta alcanzar la edad en la que puedan comer solos, se concuerda con Salazar *et al.*, 2014 que el paso de anticuerpos de tipo IgA son adquiridos por la leche de la madre que está en contacto con el parásito de *T. spiralis* en el caso de nuestro estudio.

Por eso es que para corroborar la protección generada de las madres a los productos a través de la placenta y de la leche se emplean técnicas que son conocidas como de sándwich, que son técnicas específicas con una mayor sensibilidad, las cuales mediante el uso de un segundo anticuerpo genera una reacción antígeno-anticuerpo para ver la presencia de los anticuerpos presentes en ese animal, como Randazzo *et al.*, 2013 reportan que su trabajo aporta información novedosa acerca de la concordancia entre las

pruebas que confirmen la trichinellosis, para lo que ellos recomiendan que sea más de una técnica inmunoserológica, para lo que ellos usaron IFI, ELISA y la inmunoelectrotransferencia o Western blot, al igual que Malandrini *et al.*, 2010 remarcan que los métodos de diagnósticos que se llevan a cabo en cerdos para detectar *T. spiralis*, tienen el inconveniente de que se realizan sólo post-mortem, por lo que sus resultados confirman que los métodos serológicos, en particular, la prueba de ELISA, constituye una herramienta sumamente útil para la vigilancia epidemiológica al proveer oportunidades para la detección rápida de la infección por *Trichinella* en cerdos vivos, la implementación de éste test permite realizar este trabajo en los porcinos para ofrecer un saneamiento. Se concuerda con Randazzo *et al.*, 2013 y con Malandrini *et al.*, 2010, que estos exámenes son para una rápida detección de trichinellosis, y pueden llevarse a cabo en individuos vivos, además de dar un resultado específico, por eso es conveniente usar más de una técnica inmunoserológica como lo menciona Randazzo *et al.*, 2013 para dar la confirmación de la enfermedad, en este estudio usamos diferentes técnicas indirectas para confirmar la presencia de *T. spiralis* en ratas Long Evans y ratones Balb/c, la primer técnica aplicada fue la de Dot-ELISA que es específica y de alta sensibilidad, con la cual en los animales adultos se encuentran anticuerpos de tipo IgG, IgM e IgA desde el primer mes hasta los 3 meses de infección con *T. spiralis*, en los productos retados, tanto ratas como ratones tenemos que a los 2, 4 y 6 meses de edad ya con el reto de *T. spiralis*, también están presentes los diferentes anticuerpos que son IgG, IgM e IgA, y en los productos de seguimiento, se observa que las ratas infectadas con 500 LI existe presencia de anticuerpos IgG, IgM e IgA desde los 2 hasta los 6 meses de seguimiento, las ratas de 750 LI para IgG e IgA es positivo a los 2, 4 y 6 meses, pero para IgM a los 2 meses es negativo solamente, las ratas de 1000 LI dan positivo a los 2, 4 y 6 meses de seguimiento, los ratones de 125 LI están positivos a los 2, 4 y 6 meses, pero los ratones de 250 LI para IgG hay interacción antígeno-anticuerpo a los 2, 4 y 6 meses, para IgM e IgA a los 2 meses da negativo, 4 y 6 meses es positivo.

La inmunofluorescencia indirecta por medio del uso de anticuerpos marcados que fueron puestos en conjunto con los sueros sobre las larvas, arrojó un marcaje positivo para anticuerpos policlonal, IgG e IgA en ratas adultas infectadas con las diferentes cargas

parasitarias 3 meses después de la infección y positivo para IgM e IgG en ratones adultos a los 3 meses de infección. En el grupo de animales retados se obtuvo que al mes y a los 3 meses del reto da positivo en todas las cargas de ratas, con excepción que en las ratas retadas con 500 LI para IgG e IgA a los tres meses da negativo, en el caso de los ratones también dan positivo para IgA, IgM e IgG desde el primer mes, hasta el tercer mes del reto, a excepción de los ratones de 125 y 250 a los 3 meses da negativo para IgA, debido al tiempo de infección. Los animales de seguimiento, en el caso de las ratas con las diferentes cargas, se observa que para anticuerpos policlonales e IgG es positivo, pero para IgA es negativo, para los ratones de seguimientos de 125 y 250 LI se aprecia que al mes de seguimiento es positivo para IgA, IgM e IgG, pero a los 3 meses de seguimiento para IgA e IgM da negativo, en base a lo que observó Maldonado *et al.*, 2011, en el grupo de ratas inmunizadas con AST, presentó anticuerpos post-inmunización al sacrificio en sueros de ratas Nut y DN, la fluorescencia se presentó en la superficie de la LI y en el interior de ella, concordamos en la presencia de los anticuerpos en el interior y en la cutícula de la LI de *T. spiralis*, y al igual que Moreno *et al.*, 1996, que demostraron que los antígenos de *T. spiralis* son reconocidos por anticuerpos de tipo IgG del huésped que reaccionan con el esticosoma, los anticuerpos IgM reaccionan con la cutícula del parásito, mientras que los anticuerpos de IgA reaccionan con antígenos de superficie corporal de la larva, con lo cual nuestro estudio nos deja observar la fluorescencia en las diferentes partes de la LI.

Actualmente la trichinellosis sigue siendo una enfermedad endémica en diferentes lugares geográficos, existen casos reportados en México por Vázquez *et al.*, 2012 y en Argentina por Sequeira *et al.*, 2013, por eso es que se considera de suma importancia seguir con el monitoreo constante y los trabajos a realizar para disminuir los casos de trichinellosis que se presenten.

CONCLUSIÓN

- La carga parasitaria es un determinante en el número de productos que se tiene.
- Las madres infectadas con *T. spiralis* le transfieren anticuerpos al producto.
- Se identifican anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA en productos de madres infectadas, ratas con 500, 750 y 1000 LI de *T. spiralis* y ratones con 125 y 250 LI de *T. spiralis* en una dilución de 1:500, desde los 2 meses de edad hasta los 6 meses.
- Además de observar el paso de anticuerpos de la madre al producto, se determina que el paso de anticuerpos sí confiere la protección ante la infección primaria de *T. spiralis*.
- La protección generada por la madre a los productos, no genera malformación en los productos.

PERSPECTIVAS

- Los resultados obtenidos en éste trabajo, demuestran que además de existir el paso de anticuerpos de la madre al producto, éstos le confieren protección ante un segundo contacto con el parásito, para lo que se recomienda continuar con el estudio de la protección que brindan los anticuerpos al pasar al producto.
- El cerdo es el principal vector transmisor de *Trichinella spiralis* al hombre, por lo que se recomienda evaluar en éste modelo el paso de anticuerpos maternos por medio de la leche materna y calostro, para ver si existe protección como se observó en este trabajo.
- La Organización Mundial de la Salud reporta trichinellosis como una parasitosis cosmopolita y re-emergente, por lo que es de suma importancia el diagnóstico y el rápido tratamiento para controlar la zoonosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Figueroa B R, Bautista G, Rojas J, De Nova M E, Ixta O, Martínez F. 2000. Experimental Swine Trichinellosis: Use of Dot_ELISA and Western Blot with Excretion /Secretion Antigens (ES) from Infective Larvae to Detect Anti-*Trichinella spiralis* Antibodies. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42:57- 62.).
- Armed Forces. 1957. Institute of Pathology. Manual of Histologic and special staining technics. Washington, D.C. p. 1-36.
- Ayala, Víctor Sanabria, y Abraham Landa Piedra. 2007. Anticuerpos: Propiedades Sus, Aplicaciones y perspectivas. Revista Médicas UIS 20.1.
- Battistoni Bono, Florencia María, Marengo Rafael, Orcellet Viviana, Peralta José Luis, Plaza Dana, Ronchi Diego, Chiaraviglio Juan, Bolatti Nicolás, Imoberdorf Yanina, Pujato Andrés. 2015. Determinación de *Trichinella spp.* en jabalí (*Sus scrofa*). Vet. Arg. Vol. XXXII. N° 321.
- Barbera Joan Puig. 2004. Vacunas y embarazo (y II): la protección del recién nacido mediante la vacunación de la embarazada. Atención Primaria. Pp 154-60.
- Berumen de la Torre Vicente, Muñoz Escobedo José J., Moreno García María A. 2002. Trichinellosis en perros callejeros de la ciudad de Zacatecas México. Parasitol Latinoam 57:72-74.
- Bradford H, Lancetti A. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. A. Biochemistry. Pp. 248-254.

- Builes Cuartas Lorena Marcela y Laverde Trujillo Laura María. 2009. Triquinelosis una zoonosis parasitaria. Ces medicina veterinaria y zootecnia. Vol. 4 Núm. 2 pp 130 – 135.
- Bruschi F y Chiumiento L. 2012. Immunomodulation in Trichinellosis: Does *Trichinella* Really Escape the Host Immune System? Endocrine, Metabolic and Immune Disorders. 12:4-15.
- Cosoroaba I, Orjanu N. 1998. Congenital trichinellosis in the rat. Vet Parasitol. Pp. 147-151
- Chappuis G. 1998. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. Vaccine, Vol. 16. Pp. 1468-1472.
- Chávez Guajardo Elsa Gabriela, Morales Vallarta Mario R., Saldivar Elías Sergio J., Reveles Hernández R. Gabriela, Muñoz E. José Jesús, Moreno García María Alejandra. 2010. Efecto del Albendazol en ratas Long Evans gestantes e infectadas con *T. spiralis*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. Volumen 29, número 4, pp. 60-65.
- Chávez Guajardo Elsa G., Muñoz Escobedo José Jesús, Reveles Hernández Gabriela, Rivas Gutiérrez Jesús, Moreno García María Alejandra. 2007. Efecto de la temperatura en la viabilidad e infectividad de *Trichinella spiralis*, Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. Volumen 26, número 2, pp. 105-109.
- Chávez Guajardo Elsa Gabriela, Saldivar Elías Sergio, Muñoz Escobedo José Jesús, Moreno García María Alejandra. 2006. Trichinellosis una zoonosis vigente. Revista Electrónica de Veterinaria Vol. VII, Num. 05 Pag. 1 – 15.

- Chávez Guajardo Elsa Gabriela. 2009. Detección de los cambios fenotípicos y genotípicos en productos de ratas Long Evans infectadas con *Trichinella spiralis* y tratadas con albendazol. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pp. 68.
- Chávez Ruvalcaba María Isabel, Reveles Hernández Rosa Gabriela, Muñoz Escobedo José Jesús, Maldonado Tapia Claudia Herminia, Moreno García María Alejandra. 2011. Utilidad del modelo experimental de cerdo en el estudio de tratamiento de la Trichinellosis. REDVET. Vol. 12 N° 5B, pp 1-18.
- Cox FE. 2002. History of Human Parasitology. Clinical Microbiology Reviews. 15(4):595-608.
- Cui J, Wang ZQ, Han HM. 2006. Congenital transmission of *Trichinella spiralis* in experimentally infected mice. Helminthologia. Pp. 7-10.
- De la Rosa López Hernán, Moreno García María Alejandra, Reveles Rosa Gabriela. 2011. Evaluación de la rifampicina en la infección por *Trichinella spiralis* en modelo experimental murino en fase muscular. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Q.F.B.
- Despommier, Gwadz, Hotez, Knirsch. 2005. Parasitic Diseases. Fifth edition; Pag. 3 - 4.
- Despommier Dickson y Chen Steven X. 2012. Division de of Environmental Health Sciences Mailman School of Public Health. Universidad de Columbia.
- Dubinský P., Böör A., Kinceková J., Tomasovicová O., Reiterová K., Bielík P. 2001. Congenital Trichinellosis? Case report. 10th international conference Trichinellosis (ICT 10). Parasite. Vol.8. Pp 180-182.

- Fariña Fernando Adrián, Pasqualetti Mariana, Cardillo Natalia, Aronowicz Tatiana, Ercole Mariano, Krivokapich Silvio, Ribicich Mabel. 2016. Evaluación de la transmisión galactógena de *Trichinella patagoniensis* en ratones BALB/c. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 48. Pp 101-104.
- Gottstein B, Pozio E and Nöckler K. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. Clin Microbiology Rev jan; 22(1):127-145.
- Herrera Aguirre Ana Gabriela, Rodríguez Tapia Jazmín, Suárez Aceves Rodrigo, Hernández Bautista Víctor Manuel. 2013. El sistema inmune neonatal y su relación con la infección. Alergia, Asma e Inmunología. Vol. 22. Pp.
- <http://www.trichinella.org/biology.htm> [Revisada 05 Febrero 2015].
- <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/nematodos/img/Trichinellaciclo.jpg>
- Kozar Zbigniew, Kozar Maria. 1965. A Comparison of the Infectivity and Pathogenicity of *Trichinella spiralis* Strains from Poland and Kenya. Journal of Helminthology. Volume 39. Pp 19-34.
- Krivokapich Silvio J., Pozio Edoardo, Gatti Graciana M., Gonzalez Prous Cinthia L., Ribicich Mabel, Marucci Gianluca, La Rosa Giuseppe, Confalonieri Viviana. 2012. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. International Journal for Parasitology. 42(2012) 903-910.
- Laredo S. V. T., Martínez M. P. L., Reveles R. G., Muñoz J. J. E., Moreno M. A. 2012. Modificación de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans inmunizadas con antígeno soluble total de *Trichinella spiralis* y sacrificadas en diferentes tiempos. Rev. Ibero-Latinoam. Pp. 160-166.

- Larraín de la C. Demetrio, Carvajal C. Jorge. 2008. Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria. Boletín Escuela de Medicina U.C. Vol. 33. Pp. 20-30.
- Laverde Trujillo Laura María, Builes Cuartas Lorena Marcela, Masso Cardona Carlos Julio. 2009. Detección de *Trichinella spiralis* en cerdos faenados en dos plantas de beneficio en el municipio de Bello. Ces medicina veterinaria y zootecnia Vol. 4 Núm. 2 pp 1 – 10.
- Luna Sánchez Berenice, Sánchez-Rodríguez Sergio H. 2006. Trichinellosis humana. Archivos de medicina. Vol. 2 Num. 004 pp. 1- 9.
- Mamani Yujra Reveca, Tito Ramírez Erika. 2011. Inmunoglobulinas. Revista de Actualización Clínica Investiga. Vol. 13. Pp. 663-666.
- Malandrini Jorge, Molina Viviana, Soria Claudia, Pizarro Carmen. 2010. Detección de Tricinellosis con diferentes metodologías. Ciencia. Col. 5. Pp. 25-34.
- Maldonado Tapia Claudia, Reveles Hernández Rosa Gabriela, Saldívar Elías Sergio Javier, Muñoz Escobedo José Jesús, Morales Vallarta Mario, Moreno García María Alejandra. 2007. Evaluación del efecto protector de 2 inmunógenos de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans con modificación nutricional e infectado con *Trichinella spiralis*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. Volumen 26. Pp. 110-114.
- Maldonado Tapia Claudia Herminia, Vallarta Mario Morales, Reveles Hernández Rosa Gabriela, Muñoz Escobedo José Jesús, Moreno García Alejandra. 2011. Utilidad de la Técnica de inmunofluorescencia indirecta en ratas Long Evans nutridas, desnutridas, infectadas con *T. spiralis* e inmunizadas con el inmunógeno de 45kDa. REDVET. Vol. 11. Pp- 1-13.

- Maldonado Tapia Claudia, Bracamontes Maldonado Nitzaye, López Bernal Susana, Muñoz Escobedo Jesús J., Chávez Guajardo Elsa, Moreno García. 2015. Anti-*T. spiralis* antibodies detection in some localities of Zacatecas (México). International Archives of Medicine. Vol. 8 No. 216.
- Mitreva M y Jasmer DP. 2006. Biology and genome of *Trichinella spiralis*. WormBook. Pp. 1-21.
- Moreno García María Alejandra, Maldonado Tapia Claudia H., García Mayorga Elda Araceli, Reveles Hernández Rosa Gabriela, Muñoz Escobedo José Jesús. 2009. Fase intestinal de *Trichinella spiralis* en modelo murino. Acta Biol. Colomb, Vol. 14 Num. 1, Pag 203 – 210.
- Moreno García María Alejandra, Maldonado Tapia Claudia Herminia, Reveles Hernández Rosa Gabriela, Gutiérrez López Julián, Muñoz Escobedo José Jesús. 2008. Detección y permanencia de anticuerpos anti-*Trichinella* en ratas Long Evans productos de madres infectadas con *Trichinella spiralis*. RECVET. Vol. III, N° 10, pp. 1-15.
- Moreno MA, Maldonado CH, Chávez I, Reveles RG, Quiroz Z, Muñoz JJ. 2012. El estudio de *Trichinella spiralis* en modelos experimentales. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 13(7)1-12.
- Moreno García María Alejandra, García Mayorga Elda Araceli, Saldívar Elías Sergio Javier, Reveles Hernández Rosa Gabriela, Muñoz Escobedo José Jesús. 2012. Evaluación del efecto protector de 3 inmunógenos en modelo experimental murino y cerdo infectados con *Trichinella spiralis*. REDVET. Vol. 13. Pp. 1-12.
- Muñoz JL. 2013. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la resiniferatoxina en fase intestinal en la infección por *Trichinella spiralis* en un modelo murino. Zacatecas, Página 154, México. Tesis de Maestría en Ciencias

Biológicas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. 120 págs.

- Muñoz E., Jesús; Saldivar Elías, Sergio; Reveles H., Gabriela; Muñoz M., Yersinia; Moreno G., María Alejandra. 2007. Características de la célula nodriza en diferentes modelos experimentales infectados con *Trichinella. Spiralis*. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. Vol. VIII, Núm. 1, pp. 1-10.
- Núñez G. G., Gentile T., Cristodero M., Venturiello S. M., 1999. Respuesta inmune y pasaje transplacentario de larvas migrantes en triquinellosis murina durante la preñez. Cátedra de inmunología facultad de farmacia y bioquímica, Universidad de Buenos Aires Argentina. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. México. Pp. 49.
- Ouchterlony O. 1958. Métodos de difusión-en-gel para análisis inmunológico. Prog alérgicos. Pp. 1-78.
- Ortiz Rivera Claudia Jimena. 2013. Eosinofilia y parasitismo. Revista Gastrohnp. Volumen 15. Pp. 41-48.
- Peña Martínez José. 2009. Inmunoglobulinas. Inmunología. <http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/inmunologia/tema03/etexto03.htm>
- Pozio Edoardo. 2007. World distribution of *Trichinella spp.* infections in animals and humans. Veterinary Parasitology 149 (1-2).
- Pozio Edoardo, Hoberg Eric, La Rosa Giuseppe, Zarlenga Dante S. 2009. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. Infection, Genetics and Evolution. 9(2009) 606-616.

- Pozio Edoardo, Zarlenga Dante S. 2013. New pieces of the *Trichinella* puzzle. International Journal for Parasitology.
- Pozio Edoardo. 2014. Searching for Trichinella: not all pigs are created equal. Trends in Parasitology, January 2014, Vol. 30, No. 1.
- Purizaca Benites Manuel. 2009. La placenta y la barrera placentaria. Revista peruana de ginecología y obstetricia. Pp. 270-278.
- Raff H. 2000. Secretos de la Fisiología. Editorial Mc. Graw-Hill. Philadelphia, Pennsylvania, USA, pp. 235-236.
- Ramírez Valenzuela Manuel. 1981. Epidemiología de la Triquinelosis. Ciencia Veterinaria. Pp. 228-334.
- Ramos Bello Dolores, Llorente Luis. 2009. Cincuentenario del descubrimiento de la estructura química de los anticuerpos. Reumatol Clin.; 5 (6) :280–284.
- Randazzo Viviana, La Sala Luciano Francisco, Costamagna Sixto Raúl. 2013. Determinantes de infestación durante un brote de trichinellosis en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Vol. 47. Pp. 587-93.
- Reveles RG, Saldivar SJ, Maldonado CH, Muñoz JJ, Moreno MA. 2011. Evaluación de la infección de *Trichinella spiralis* en cerdos gonadectomizados, Zacatecas, México. Acta Med Per. 28(4):211-216.
- Reveles Hernández Rosa Gabriela, Maldonado Tapia Claudia, Chávez Ruvalcaba Isabel, Muñoz Escobedo José Jesús, Moreno García María Alejandra. 2014. Vigencia de los Postulados de Koch en la reproducción de *Trichinella spiralis* en modelo experimental. REDVET Volumen 15 N° 05.

- Riva, E., Steffan, P. E., & Fiel, C. A.. 2007. Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global. Mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América Latina y el Caribe, Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 94-109.
- Roa Ignacio, Smok S. Carolina, Prieto G. Ruth. 2012. Placenta: anatomía e histología comparada. Int. J. Morphol. Pp. 1490-1496.
- Rogerio AP y Anibal FF. 2012. Role of Leukotrienes on Protozoan and Helminth Infections. Mediators of Inflammation. Pp. 1-13.
- Rodríguez Cortés Y. M., Mendieta Zerón H. 2014. La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. Revista de Medicina e Investigación. Pp. 28-34.
- Salazar John Jairo, Loaiza Usuga Pablo. 2014. Catabolismo de los anticuerpos maternos y duración de la inmunidad vacunal de las bacterinas contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. Sitio Argentino de Producción Animal. Pp. 1-23.
- Sanabria Ayala Víctor, Landa Piedra Abraham. 2007. Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas. Revista de los estudiantes de medicina de la Universidad Industrial de Santander.
- Sánchez Luna Berenice, Sánchez Rodríguez Sergio H. 2006. Triquinelosis humana. Archivos de Medicina. Pp. 1-11.
- Sequeira Gabriel J., Dalla Fontana María L., Zbrun María V., Soto Lorena P., Frizzo Laureano S., Zarazaga María del Pilar, Sánchez Inés C., Signorini Marcelo L. 2013. Estudio epidemiológico de los casos de triquinelosis

registrados en la provincia de Santa Fe, Argentina, 1998–2009. Rev Panam Salud Pública. Pp. 363-365.

- Steffan Pedro. 2006. Trichinellosis en el cono sur de américa: situación actual y prospectiva de una zoonosis parasitaria ancestral. Información veterinaria CMVPC; 151:42-45, pp 1 – 4.
- Valencia V. Claudio, Muñoz A. Héctor y Torres H. Marisa. 2003. Triquinosis: Entre el temor y el deber de informar la fuente de infección. Rev Chil Infect; 20 (2): 99-103.
- Van Die I y Cummings RD. 2009. Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response. Glycobiology. Pp. 2-12.
- Vázquez Tsuji Oscar, Campos Rivera Teresita. 2012. Epidemiología de la triquinosis en México. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Vol. XXVI. Pp. 166-167.
- Vega, E., Barrera, M., Abeledo, M. A., Rodríguez Moltó, M., Castell, S., & Frías Lepoureau, M. T. 2011. Anticuerpos maternos frente al virus de la peste porcina clásica en crías de cerdas inmunizadas con candidato vacunal de subunidad proteica (E2). Revista de Salud Animal. Pp 51-56.
- Webster, P., Kapel, C.M. 2005. Studies on vertical transmission of Trichinella spp. in experimentally infected ferrets (*Mustela putorius furo*), foxes (*Vulpes vulpes*), pigs, guinea pigs and mice. Veterinary Parasitology. Pp. 255-262.
- Zubeldia José Manuel, Baeza Ma. Luisa, Jáuregui Ignacio, Senent Carlos J. 2012. El sistema inmunitario y la alergia. Capítulo 4 del libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA. 1ª Edición. Pp. 51-59.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Leticia Angélica de Avila Elías.

Candidata para el Grado de

Maestra en Ciencias con Acentuación en Microbiología.

**Tesis: SWITCH DE INMUNOGLOBULINAS ENTRE MADRE Y PRODUCTO
INFECTADOS CON *Trichinella spiralis* EN MODELO MURINO.**

Campo de Estudio: Microbiología

Datos personales: Nacida en Zacatecas, Zac el 20 de Junio de 1986, hija de María Luisa Elías Hernández y José Luis de Avila Gamboa.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Zacatecas, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2005.